

Einfluss von Naturstoffen auf den HOG-Signalweg in *Candida albicans*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Janine Wesolowski

aus Salzwedel

1. Referentin:

Professor Dr. Ursula M. Bilitewski

2. Referent:

Professor Dr. Ludger Beerhues

eingereicht am:

13.01.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am:

09.06.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Wesolowski, J., Hassan, R.Y.A., Hodde, S., Bardroff, C. & Bilitewski U. (2008): Sensing of oxygen in microtiter plates: a novel tool for screening drugs against pathogenic yeasts. *Anal Bioanal Chem* **391**(5):1731-7.

Wesolowski, J., Hassan, R.Y.A., Reinhardt, K., Hodde, S., Bilitewski, U. (2009): Antifungal compounds redirect metabolic pathways in yeasts: metabolites as indicators of modes of action. *J Appl Microbiol.* [Epub ahead of print]

Tagungsbeiträge

Wesolowski, J., Klippel, N., Reinhardt, K. & Bilitewski, U. (2006): Mode of Action of Ambruticin VS-3 an Antifungal Natural Product. Posterbeitrag, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena.

Bardroff, C., Hodde, S., Wesolowski, J. & Bilitewski, U. (2007): Growth Characteristics and Stress Response Parameters of Yeasts Treated with Fungicidal Secondary Metabolites. Posterbeitrag, Workshop Chemical Genomics, Braunschweig.

Wesolowski, J. & Bilitewski, U. (2008): Antifungal Agents Targeting the Signal Transduction Pathway of the Two-Component Histidine Kinase Cos1p in the Human Pathogen *Candida albicans*. Posterbeitrag, 9th ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, New Jersey, USA.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung.....	IX
Summary.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Der humanpathogene Hefepilz <i>Candida albicans</i>.....	1
1.1.1. Eigenschaften	1
1.1.2. Klinische Relevanz und Virulenzfaktoren	2
1.2. Antifungische Substanzen	3
1.2.1. Antimykotika	3
1.2.2. Mikrobielle Naturstoffe	4
1.2.2.1. <i>Quellen von Naturstoffen</i>	4
1.2.2.2. <i>Myxobakterien (Myxococcales) und deren</i>	
<i>Sekundärmetabolite</i>	4
1.2.3. Ambruticine	5
1.2.4. Jerangolide	7
1.2.5. Phenylpyrrole: Pyrrolnitrin und Fludioxonil	7
1.3. Osmotische Stressabwehr in Hefen	9
1.3.1. Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme	9
1.3.2. Der HOG-Signalweg in <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. albicans</i>	12
1.3.3. Glycerinbiosynthese in Hefen	14
1.4. Zielsetzung	16
2. Material & Methoden	18
2.1. Material.....	18
2.1.1. Geräte	18
2.1.2. Mikrotiterplatten	19
2.1.3. Chemikalien und Enzyme	19
2.1.4. Substanzen	19
2.1.5. Medien und Agarnährböden	20
2.1.6. Antikörper	20
2.1.7. Hefen, filamentöse Pilze und Zellkultur	21
2.2. Methoden	22
2.2.1. Bestimmung der optischen Dichte	22
2.2.2. Bestimmung der Zellzahl	22
2.2.3. Kultivierung von <i>C. albicans</i>	22
2.2.3.1. <i>Kultivierung in Kolben</i>	22
2.2.3.2. <i>Kultivierung in 96Well-Mikrotiterplatten</i>	23
2.2.3.3. <i>Agar-Diffusionstest</i>	23

2.2.3.4.	Wachstum auf Agar.....	24
2.2.4.	Sauerstoffmessung	24
2.2.5.	Glycerinbestimmung im Medium	25
2.2.6.	Ethanolbestimmung im Medium.....	26
2.2.7.	Proteinanalytik	26
2.2.7.1.	Präparation der Zellextrakte	26
2.2.7.2.	Proteinbestimmung	28
2.2.7.3.	Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese	28
2.2.7.4.	Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.2.7.5.	Western-Blot Analyse.....	30
2.2.7.6.	Immunodetektion.....	30
2.2.7.7.	Entfernen der Antikörper von der Membran	31
2.2.8.	Transkriptionsanalysen	32
2.2.8.1.	Präparation und Belegung des <i>C. albicans</i> DNA-Chips mit ausgewählten Oligonukleotiden.....	32
2.2.8.2.	Genomanalyse von <i>C. albicans</i>	34
2.2.8.3.	Probenvorbereitung und RNA Isolierung	34
2.2.8.4.	cDNA Synthese	35
2.2.8.5.	cRNA Synthese	36
2.2.8.6.	Hybridisierung, Waschen, Färben und Scannen	37
2.2.8.7.	Datenanalyse.....	37
2.2.9.	Phagozytose-Assay	39
2.2.10.	Statistische Auswertung und verwendete Programme.....	40
3.	Ergebnisse.....	41
3.1.	Wachstumsanalysen von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil.....	41
3.1.1.	Wachstumshemmung im Agar-Diffusionstest.....	41
3.1.2.	MIC-Bestimmung von Ambruticin VS-3	43
3.1.3.	Wachstum von <i>C. albicans</i> auf festen und in flüssigen Medium nach Substanzbehandlung	44
3.2.	Untersuchungen der Wirkung der Substanzen auf metabolische Prozesse in <i>C. albicans</i>.....	48
3.2.1.	Glycerinbestimmung bei <i>C. albicans</i> nach Substanzbehandlung	49
3.2.2.	Ethanolbestimmung bei <i>C. albicans</i> nach Substanzbehandlung.....	52
3.2.3.	Sauerstoffverbrauch nach Behandlung von <i>C. albicans</i> mit Ambruticin VS-3, Pyrrolnitrin und Myxothiazol	55
3.3.	Untersuchung der Phosphorylierung von Hog1 nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Fludioxonil.....	57
3.4.	Untersuchung der Genexpression in <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A	58
3.4.1.	Genexpressionsanalyse stressassoziiierter Gene in <i>C. albicans</i>	59
3.4.1.1.	MAPK-Signalwege.....	61
3.4.1.2.	Glycerinbiosynthese	62
3.4.1.3.	Metabolismus	63
3.4.2.	Transkriptomanalyse von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit Ambruticin VS-3.....	65
3.5.	Untersuchung von Ambruticin VS-3 im Phagozytose-Assay	67

4. Diskussion	70
4.1. Targetidentifizierung der Testsubstanzen: Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden.....	70
4.1.1. Unterschiedliches Wachstumsverhalten der <i>C. albicans</i> -Stämme nach Substanzbehandlung	71
4.1.1.1. Wildstämme.....	71
4.1.1.2. Mutanten	72
4.1.2. Einfluss der Substanzen auf die Glycerinbiosynthese in <i>C. albicans</i>	73
4.1.2.1. Wildstämme: 1386 und CAF2-1.....	74
4.1.2.2. <i>C. albicans</i> -Histidinkinase-Mutanten: $\Delta sln1$, $\Delta chk1$ und $\Delta cos1$	76
4.1.2.3. <i>C. albicans</i> -Deletionsmutanten: $\Delta skk1$, $\Delta pbs2$, $\Delta hog1$ und $\Delta gpp1$	78
4.1.2.4. <i>C. albicans</i> -Deletionsmutante: $\Delta sit4$	79
4.1.3. Phosphorylierung der MAPK Hog1 durch Ambruticin VS-3 und Fludioxonil.....	79
4.1.4. Einfluss von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A auf die Genexpression	81
4.1.4.1. Veränderung der Expression von stressassoziierten Genen in <i>C. albicans</i> durch die Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.....	81
4.1.4.2. Transkriptomanalyse-weitere Hinweise auf betroffene Signalkaskaden in <i>C. albicans</i> durch Ambruticin VS-3.....	85
4.2. Einfluss von Ambruticin VS-3 auf die Aufnahme von <i>C. albicans</i> durch Immunzellen	89
4.3. Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkung von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil.....	91
5. Literaturverzeichnis	93
6. Anhang.....	104
6.1. Haushaltsgene von <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	104
6.2. Liste der ausgewählten Gene	106
Danksagung	114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologische Erscheinungsformen von <i>C. albicans</i> (Abbildung von Ernst, 2000)....	2
Abb. 2: Strukturformeln und Molgewichte der Ambruticine S und VS	6
Abb. 3: Strukturformeln von Jerangolid A und Ambruticin VS-3	7
Abb. 4: Strukturformeln von Pyrrolnitrin und Fludioxonil	8
Abb. 5: Zwei-Komponenten-Signaltransduktion in Hefen	10
Abb. 6: Histidinkinasen in <i>C. albicans</i>	11
Abb. 7: HOG-Signalweg in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Candida albicans</i>	12
Abb. 8: Schematische Darstellung der Hauptelemente der MAPK-Signaltransduktion in <i>C. albicans</i> nach Monge <i>et al.</i> (2006).....	13
Abb. 9: Wichtige Stoffwechselwege in <i>S. cerevisiae</i> nach Nevoigt & Stahl (1997).....	15
Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Arrays.	33
Abb. 11: Plättchentest mit Ambruticin VS-3 [1 mg/mL] (oben) und Methanol (unten) als Lösungsmittelkontrolle durchgeführt mit <i>C. albicans</i> $\Delta sit4$	41
Abb. 12: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) von Ambruticin VS-3 bei <i>C. albicans</i> 1386	43
Abb. 13: Wachstumstest mit <i>C. albicans</i> auf Agar.....	46
Abb. 14: Wachstum von <i>C. albicans</i> CAF2-1 (A) und der $\Delta sln1$ -Mutante (B) unter Einfluss von Methanol (Kontrolle), Ambruticin VS-3 [1 μ g/mL], Jerangolid A [1 μ g/mL] und Fludioxonil [20 μ g/mL].	47
Abb. 15: Bestimmung von extrazellulärem Glycerin bei <i>C. albicans</i> 1386.	49
Abb. 16: Extrazelluläre Glycerinbestimmung nach Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil sowie Methanol (Kontrolle) bei <i>C. albicans</i> CAF 2-1 (Referenzstamm) und den Deletionsmutanten $\Delta sln1$, $\Delta chk1$, $\Delta cos1$, $\Delta sit4$, $\Delta hog1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta ssk1$	51
Abb. 17: Bestimmung von Ethanol bei <i>C. albicans</i> 1386.....	52
Abb. 18: Ethanolbestimmung nach Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil sowie Methanol (Kontrolle) beim Referenzstamm <i>C. albicans</i> CAF 2-1 und den Deletionsmutanten $\Delta sln1$, $\Delta chk1$, $\Delta cos1$, $\Delta sit4$, $\Delta hog1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta ssk1$	54
Abb. 19: Wachstum und Sauerstoffverbrauch von <i>C. albicans</i> 1386 behandelt mit Ambruticin VS-3 und Pyrrolnitrin..	55
Abb. 20: Wachstum und Sauerstoffverbrauch von <i>C. albicans</i> 1386 inkubiert mit Myxothiazol.	56
Abb. 21: Western-Blot zur Detektion von phosphoryliertem Hog1 (Anti-Phospho-p38 Antikörper) und Hog1 (Anti-Hog1 Antikörper)..	58
Abb. 22: Schematische Darstellung der Anzahl an signifikant hoch- und herunterregulierten Genen der <i>C. albicans</i> -Stämme 1386, CAF2-1 und $\Delta sit4$ nach einstündiger Inkubation mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.	60
Abb. 23: Phagozytose von 1386, CAF2-1 und $\Delta cos1$ durch RAW264.7-Makrophagen nach 30 min Koinkubation.	67
Abb. 24: Phagozytose von <i>C. albicans</i> durch RAW264.7-Makrophagen nach 30 min Koinkubation.....	69

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Antikörper	20
Tab. 2: <i>C. albicans</i> -Stämme und Mutanten	21
Tab. 3: Filamentöse Pilze.....	21
Tab. 4: Rezept für Lysepuffer nach Martin <i>et al.</i> (2000).....	27
Tab. 5: Blotpuffer und TBS-T Puffer	30
Tab. 6: Kontrollen für <i>S. cerevisiae</i>	37
Tab. 7: Kontrollen für <i>C. albicans</i>	37
Tab. 8: Einfluss von Substanzen auf das Wachstum verschiedener <i>C. albicans</i> -Stämme und filamentöser Pilze.....	42
Tab. 9: Expression von <i>C. albicans</i> -Genen der MAPK-Signalwege nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.	61
Tab. 10: Expression von <i>C. albicans</i> Genen der Glycerinbiosynthese nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.	62
Tab. 11: <i>C. albicans</i> -Gene aus diversen Prozessen reguliert durch Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.	64
Tab. 12: Regulierte Gene nach einstündiger Ambruticin VS-3-Behandlung von <i>C. albicans</i> 1386, CAF2-1, $\Delta sln1$ und $\Delta cos1$	66
Tab. 13: Auf dem DNA-Chip als Haushaltsgene verwendete Gene von <i>C. albicans</i>	104
Tab. 14: Auf dem DNA-Chip als Haushaltsgene verwendete Gene von <i>S. cerevisiae</i>	105
Tab. 15: Liste der ausgewählten 70 <i>C. albicans</i> -Gene (CA) und 50 <i>S. cerevisiae</i> -Gene (Y)...106	
Tab. 16: Genannotation der Transkriptom-DNA-Chips aus Kap. 3.4.2/Tab. 12.....	112

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
<	kleiner als
>	größer als
Abb.	Abbildung
AIDS	engl. <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bichinolin-4-Carbonsäure
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Corp.	Corporation
cRNA	engl. <i>complementary RNA</i>
Cu	Kupfer
CUG	Cytosin Uracil Guanin
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleinacid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence substrate</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et alii
FBS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FC	engl. <i>fold change</i>
FITC	Fluorescein 5-Isothiocyanat
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung; 9,81 m/s ²
GC	Guanin Cytosin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
<i>H. anomala</i>	<i>Hansenula anomala</i>
HOG	engl. <i>high osmolarity glycerol</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC ₅₀	engl. <i>50 % inhibitory concentration</i>
IgG	Immunoglobulin G

ink	inkomplett
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
L	Liter
LPA	Polyacrylamid
LiCl	Lithiumchlorid
m	milli
mA	Milliampere
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	millimolar
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
M	molar
MAT	engl. <i>mating type locus</i>
Mbp	Mega-Basenpaare
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase-kinase</i>
MAPKKK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase</i>
MTL	engl. <i>mating type like-locus</i>
μ	mikro
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
MIC	minimale Hemmkonzentration, engl. <i>minimal inhibitory concentration</i>
min	Minute
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
n.t.	nicht getestet, engl. <i>not tested</i>
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
OD	optische Dichte
p	pico
pM	picomolar
p.a.	pro analysi, Reinheitsgrad für Laborchemikalien
PBS	engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
pH	pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAW264.7	Mausmakrophagenzelllinie
RFU	relative Fluoreszenzeinheit (engl. <i>relative fluorescence unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
S	engl. <i>slow</i>

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sog.	sogenannte/n/r
Tab.	Tabelle
TBS-T	engl. <i>Tris-buffered Saline Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGS	Tris/Glycin/SDS
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit, engl. <i>unit</i>
V	Volt
VS	engl. <i>very slow</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YPD	engl. <i>yeast extract peptone dextrose</i>
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit waren Untersuchungen von Einflüssen von Ambruticin VS-3, Fludioxonil und Jerangolid A auf *Candida albicans*. Aus Untersuchungen an filamentösen Pilzen wie *Neurospora crassa* und *Magnaporthe grisea* war bekannt, dass es sich bei dem Target von Ambruticin VS-3 und Fludioxonil um eine Histidinkinase Typ III handelt, die in den Signalweg der osmotischen Stressantwort involviert ist. Jerangolid A kam zum Einsatz, da es eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Ambruticin VS-3 besitzt, so dass das gleiche Target vermutet wurde. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob in dem humanpathogenen Hefepilz *C. albicans* das Target der Substanzen ebenfalls die Histidinkinase Typ III Nik1/Cos1 ist.

Unter osmotischen Stressbedingungen wird der sogenannte HOG-Signalweg aktiviert, der unter anderem die Glycerinbiosynthese induziert. Die Behandlung von *C. albicans* mit den Testsubstanzen führte, genauso wie osmotische Stressbedingungen, zur Erhöhung der Glycerinkonzentration. Ergänzend wurde die Signalweiterleitung anhand von Deletionsmutanten, in denen Gene, kodierend für Proteine aus dem HOG-Signalweg, fehlten, näher betrachtet. Die Deletion der Gene *SSK1*, *PBS2* und *HOG1* führte zu keiner Veränderung der Glycerinkonzentration, was auf eine wichtige Funktion bei der Signalweiterleitung hindeutet. Darüber hinaus wurde eine Phosphorylierung der MAPK Hog1 bei den Wildstämmen nach Substanzexposition nachgewiesen. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Testsubstanzen in *C. albicans* der HOG-Signalweg aktiviert wird. Bei allen Untersuchungen erwies sich die $\Delta cos1$ -Mutante als resistent gegenüber den Substanzen, so dass angenommen werden kann, dass diese Histidinkinase Typ III auch in *C. albicans* das Target der Testsubstanzen ist.

Um den Einfluss von Ambruticin VS-3 auf *C. albicans* genauer zu verstehen, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Gene, kodierend für Proteine aus dem HOG-Signalweg und aus der Zellwandbiosynthese, wurden verstärkt exprimiert, wohingegen Gene aus dem Hyphenwachstum herunterreguliert wurden. Der Einsatz von Ambruticin VS-3 in einem in-vitro-Infektionsmodell bewirkte eine Steigerung der Phagozytoseaktivität von mit *C. albicans*-infizierten Makrophagen. Das lässt vermuten, dass Ambruticin VS-3 die Zellwandbiosynthese in *C. albicans* sekundär beeinflusst.

Summary

In this thesis, the influences of ambruticin VS-3, fludioxonil and jerangolid A on the pathogenic yeast *Candida albicans* were investigated. The target of ambruticin VS-3 and fludioxonil is known to be a type III histidine kinase, which is involved in osmotic stress signalling. This knowledge based on analyses performed with filamentous fungi such as *Neurospora crassa* and *Magnaporthe grisea*. However, the function of the histidine kinase is still not well understood. The human pathogen *C. albicans* was chosen as model system, which possess Nik1/Cos1 as type III histidine kinase and the role of Nik1/Cos1 was investigated as a target.

Under osmotic stress conditions the so-called HOG-pathway is activated, which leads to an induction of the glycerol biosynthesis. The treatment with the substances led to an increase of external glycerol of the wild type strains. In addition deletion mutants, in which genes encoding proteins of the HOG-pathway were absent, were tested with the substances. Due to the fact that no increase of glycerol concentrations was observed in the mutants $\Delta ask1$, $\Delta pbs2$ and $\Delta hog1$ it can be concluded that an intact HOG-pathway is required for the response. Further analyses of the phosphorylation status of Hog1 confirmed activation by treatment with ambruticin VS-3 and fludioxonil.

Analysis of gene expression showed an upregulation of genes related to the HOG-pathway as well as to cell wall biosynthesis, whereas hyphae-associated genes were downregulated. Cell wall biosynthesis and hyphal growth are indicators of virulence. Due to the evidence of ambruticin influences on the pathogenicity of the yeast, the compounds were tested in in vitro infection models. The internalization of the yeasts by murine macrophages was enhanced when the yeast was pre-incubated with the substance over night. This suggests that ambruticin VS-3 induces changes in the cell wall assembly of the yeast which are recognized by the macrophages.

In all investigations, the $\Delta cos1$ mutant was resistant to treatments of ambruticin VS 3, jerangolid A and fludioxonil which implies the histidine kinase Nik1/Cos1 as the target of the selected fungicides.

1. Einleitung

Die häufigsten Verursacher von humanen Pilzerkrankungen sind verschiedene *Candida*-Stämme, mit *Candida albicans* als wichtigsten Vertreter. Als kommensaler Organismus besiedelt der Hefepilz *C. albicans* die menschliche Haut sowie die Schleimhäute des oralen, gastrointestinalen und urogenitalen Traktes, ist jedoch auch die Ursache vieler Infektionen. Zu den Betroffenen gehören Menschen mit einem geschwächten Immunsystem, dem wesentlichen Risikofaktor für systemische Pilzerkrankungen. Mittlerweile beträgt die Mortalitätsrate von Kandidosen bis zu 40 % (Moran *et al.*, 2009). Das verstärkte Auftreten von klinisch relevanten Resistenzen gegenüber herkömmlichen Antimykotika stellt ein Problem bei der Behandlung von *Candida*-Infektionen dar, so dass ein wachsendes Interesse an der Entwicklung von neuen Wirkstoffen besteht.

1.1. Der humanpathogene Hefepilz *Candida albicans*

1.1.1. Eigenschaften

Candida albicans wird dem Stamm der Ascomyceta, der Klasse Saccharomycetes und der Ordnung Saccharomycetales zugeordnet (Kurtzman, 1998). Der Hefepilz bildet in Kultur kleine, weiße Kolonien mit hefeartigem Geruch (Roeder, 2004). Die obligat diploide Hefe besitzt zweimal acht Chromosomen. Zunächst galt sie als asexuell, jedoch wurde Ende der neunziger Jahre ein mating type like-locus (MTL) im Genom von *C. albicans* identifiziert, der homolog zum mating type locus (MAT) von *S. cerevisiae* ist und die Hauptregulatoren für Paarungsprozesse kodiert (Hull & Johnson, 1999).

Des Weiteren wurde eine Abweichung vom universellen genetischen Dreibuchstabencode bei *Candida*-Spezies entdeckt. Wo bei vielen Organismen das Kodon CUG die Aminosäure Leucin kodiert, wird bei Hefen der Gattung *Candida* die Aminosäure Serin gebildet (Ohama *et al.*, 1993).

Eine Besonderheit sind die verschiedenen Erscheinungsformen von *C. albicans* (Ernst, 2000; Abb. 1). *C. albicans* ist zum phänotypischen Wechsel zwischen einzelligem Hefe- und myzelartigem Hyphenwachstum befähigt (Molero *et al.*, 1998). Dieses Phänomen wird auch als Dimorphismus bezeichnet und kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Beispielsweise induzieren Temperaturen über 35°C, pH-Wert-Änderung oder Serum filamentöses Wachstum (Ernst, 2000; Calderone, 2002). Hyphen bilden sich aus einzelnen Zellen durch kontinuierliches apikales Wachstum und die einzelnen Zellen werden durch Septen voneinander getrennt. Zusätzlich ist *C. albicans* in der Lage Pseudohyphen auszu-

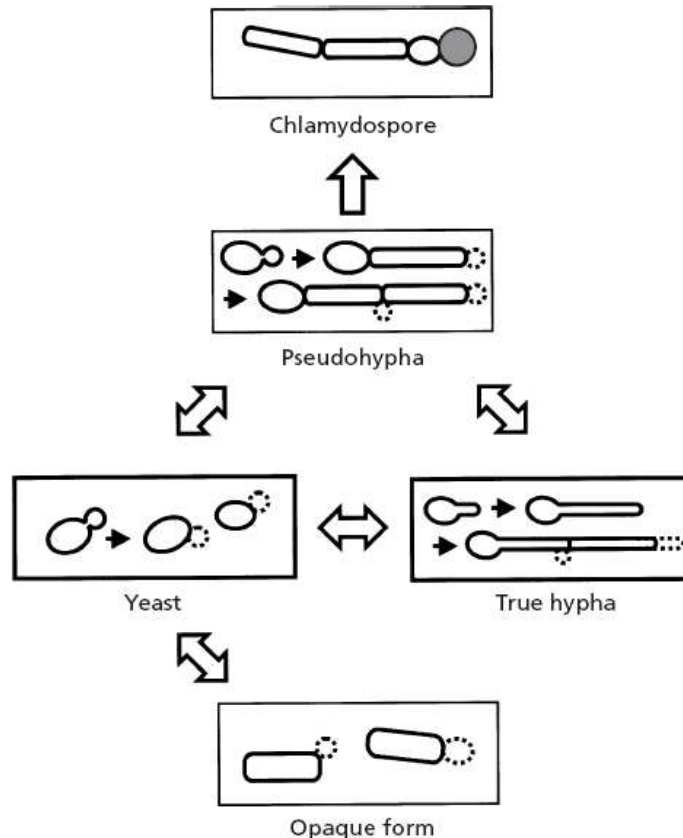


Abb. 1: Morphologische Erscheinungsformen von *C. albicans*
(Abbildung von Ernst, 2000)

bilden (Müller & Melchinger, 2006). Im Unterschied zu der Rundzellsprossung der einzelligen Hefe streckt sich die Tochterzelle um das zwei- bis vierfache des Längsdurchmessers einer Rundzelle. So besteht das Pseudomycel aus Rund- und Langzellen, welche nicht durch echte Septen getrennt sind.

Außerdem ist *C. albicans* in der Lage Dauersporen (sog. Chlamydosporen) zu bilden, die durch Nährstoffmangel induziert werden und sich als terminale Zellen an Pseudohyphen bilden. Ein weiterer morphologischer Wechsel von *C. albicans* erfolgt von normalen, weißen, kugeligen Hefen zu opaque-Zellen, die als länglich, flacher und grau beschrieben werden (Slutsky *et al.*, 1987). Beide Zelltypen scheinen beim Paarungsprozess und der Pathogenese eine besondere Rolle zu spielen (Lockhart *et al.*, 2002; Zordan *et al.*, 2006).

1.1.2. Klinische Relevanz und Virulenzfaktoren

Von den rund 150 bekannten *Candida*-Arten wurden bislang maximal 20 als Infektionserreger beschrieben (Roeder, 2004). Unter ihnen kommt *C. albicans* die größte Bedeutung zu, da diese Art ca. 50 % aller Kandidosen verursacht (Urban, 2004). Die Ausprägungen von Kandidosen reichen von lokalen Infektionen der Haut und der Schleimhäute des

oralen, gastrointestinalen und urogenitalen Traktes bis zu lebensbedrohlichen systemischen Mykosen, bei denen durch die Verbreitung des Hefepilzes über die Blutbahnen schwere Organinfektionen verursacht werden können (Urban, 2004). Dabei beträgt die Mortalitätsrate bis zu etwa 40 % (Moran *et al.*, 2009).

Eine Reihe von Virulenzfaktoren befähigt das Pathogen, sich verschiedenen Wirtsnischen anzupassen und das Überleben im Wirt zu sichern. Dazu gehört die Fähigkeit von *C. albicans* zum phänotypischen Wechsel zwischen Hefe- und Hyphenwachstum, was eine Penetration und Besiedlung des Wirts ermöglicht oder der Abwehr des Pathogens gegen Phagozyten, Fresszellen des Immunsystems, dient (Lorenz *et al.*, 2004). Weiterhin verfügt *C. albicans* über ein breites Spektrum an sekretorischen, hydrolytischen Enzymen, wie beispielweise Lipasen und Proteasen (Stehr *et al.*, 2000). Diese Enzyme dienen zum einen der Beschaffung von Nährstoffen und zum anderen dem Eindringen in tieferes Gewebe (Morschhauser *et al.*, 1997). Für die Virulenz des Pathogens spielt außerdem die Fähigkeit der Adhärenz an Wirtsoberflächen sowie die Zusammensetzung der Zellwand eine wichtige Rolle (Chaffin *et al.*, 1998; Haynes, 2001).

1.2. Antifungische Substanzen

1.2.1. Antimykotika

Derzeit werden zur medikamentösen Behandlung von Kandidosen vor allem drei Wirkstoffgruppen eingesetzt: Polyene, Triazole und Echinokandine (Cowen & Steinbach, 2008). Der wichtigste Vertreter der Polyene ist das Amphotericin B, das wegen der hohen Wirksamkeit größtenteils bei systemischen Kandidosen zum Einsatz kommt. Allerdings treten dabei häufig Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität auf. Polyene (z. B. Amphotericin B) wie auch Triazole (z.B. Fluconazol, Ketoconazol) beeinflussen die Integrität der Zellmembran. Amphotericin B wechselwirkt dabei direkt mit Ergosterol, einem wichtigen Bestandteil der Zellmembran des Pilzes, wohingegen Fluconazol die Ergosterolsynthese inhibiert (Ghannoum & Rice, 1999; Odds *et al.*, 2003; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). Die dritte Wirkstoffgruppe, die Echinokandine (z. B. Caspofungin), greifen in die Zellwandsynthese ein, indem sie den Glukansynthase-Komplex hemmen (Urban, 2004).

1.2.2. Mikrobielle Naturstoffe

1.2.2.1. Quellen von Naturstoffen

Naturstoffe sind chemische Verbindungen, welche aus der belebten Natur isoliert werden. Sie besitzen häufig biologische Aktivitäten und sind daher interessant für die Pharmaforschung. Rund 51 % der heute eingesetzten Medikamente bestehen aus Naturstoffen oder wurden basierend auf Leitstrukturen aus der Natur entwickelt (Newman & Cragg, 2007). Diese Pharmaka kommen bei der Bekämpfung von Mykosen, von bakteriellen und viralen Erkrankungen sowie in Krebstherapien zum Einsatz. Zu den Quellen von Arzneimitteln zählten in der Vergangenheit vor allem Pflanzenextrakte, z. B. aus Johanniskraut oder Pestwurz (Tang & Eisenbrand, 1992). Durch die Entdeckung von antibakteriellen und antimykotischen Wirkstoffen aus Bakterien und Pilzen wurde eine Behandlung von bis dahin tödlich endenden Infektionen möglich. Eines der ersten und wohl bekanntesten Antibiotika ist das Penicillin (Fleming, 1929), das vom Pilz *Penicillium notatum* produziert wird. Es findet bis heute therapeutische Anwendung. Produzenten von bakteriellen Naturstoffen sind die Aktinomyzeten, Pseudomonaden und Bakterien der Gattung *Bacillus*. Hinzu kommen Cyanobakterien und Myxobakterien (Reichenbach, 2001).

1.2.2.2. Myxobakterien (*Myxococcales*) und deren Sekundärmetabolite

Myxobakterien sind gram-negative, strikt aerobe, chemoorganotrophe Bodenbakterien (Knauth, 2000), welche weltweit verbreitet sind. Die meisten ernähren sich bakteriolytisch, nur eine Gruppe der Myxobakterien, aus der Gattung *Sorangien*, ist zu einer cellulolytischen Ernährung fähig (Knauth, 2000). Das Genom der Myxobakterien ist mit 9,5-10 Mbp eines der Größten unter den Bakterien (Reichenbach, 2001). Charakteristische Eigenschaften, die Myxobakterien auszeichnen, sind zum einen, dass sich die stäbchenförmigen Bakterien durch Gleiten auf festem Untergrund fortbewegen, zum anderen leben sie in Schwärmen und bilden bei Nährstoffmangel Fruchtkörper aus (Reichenbach, 2001). Dies erfordert interzelluläre Kommunikationssysteme, um den Zusammenhalt des Schwarms bzw. die Differenzierung zum Fruchtkörper zu gewährleisten (Reichenbach, 2001). Viele Myxobakterien besitzen einen ausgeprägten Sekundärmetabolismus. Von den mehr als 7500 isolierten Myxobakterien-Stämmen wurden bislang mehr als 100 neue chemische Strukturen mit zusätzlich etwa 500 Derivaten beschrieben (Bode & Müller, 2006).

Die Wirkmechanismen der vielen bereits von Myxobakterien isolierten Substanzen sind sehr unterschiedlich. Gefunden wurden Inhibitoren der pro- und eukaryotischen Protein-

synthese (z. B. Myxovalargin, Gephyronsäure), andere Substanzen blockieren eubakterielle RNA-Polymerasen (z. B. Sorangicin; Reichenbach, 2001). Es gibt Substanzen, die den Kaliumexport von gram-positiven Bakterien stimulieren (z. B. Tatrolon) und solche, die an die DNA binden (z. B. Saframycin; Reichenbach, 2001). Eine weitere Kategorie von Wirkstoffen hemmt die Atmungskette. Dabei unterscheiden sie sich in ihrem Wirkort. Einige blockieren den Komplex I (Ubiquinon-Oxidoreduktase) oder den Komplex II, andere inhibieren den Komplex III (bc₁-Komplex), wie Myxothiazol und Stigmatellin (Reichenbach, 2001). Eine weitere Gruppe von Substanzen interagiert mit dem Zytoskelett von eukaryotischen Zellen. Darunter gibt es Aktin-aktive Substanzen wie Rhizopodin, das eine Depolymerisation der Aktinfilamente bewirkt (Gronewold *et al.*, 1999), und Chondramid A, eine F-Aktin stabilisierende Substanz (Sasse *et al.*, 1998). Die Substanz Epothilon besitzt eine stabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli (Bollag *et al.*, 1995). Dadurch können die mitotischen Spindeln nicht aufgebaut werden, was die Einleitung der Apoptose (programmierter Zelltod) zur Folge hat. Eine entgegengesetzte Wirkung auf das Tubulin zeigt sich bei Tubulysin (Sasse *et al.*, 2000), das zu einem Abbau der Mikrotubuli führt. Einige der myxobakteriellen Substanzen zeigen auch einen Einfluss auf die Stressantwort bei Pilzen. So bewirken Ambruticin VS-3 sowie Pyrrolnitrin und Fludioxonil eine Induktion der osmotischen Stressabwehr (Okada *et al.*, 2005; Motoyama *et al.*, 2005a; Knauth & Reichenbach, 2000; Vetcher *et al.*, 2007).

1.2.3. Ambruticine

Die erste Struktur eines antimykotischen Antibiotikums von Myxobakterien wurde im Jahre 1977 von Ringel *et al.* veröffentlicht. Die von *Polyangium cellulosum* var. *fulvum* (heute *Sorangium cellulosum*) produzierte Substanz wurde zunächst als W7783 und später als Ambruticin bezeichnet (Ringel *et al.*, 1977). Ambruticin ist eine Cyclopropyl-Polyensäure und begründete eine völlig neue Klasse von Antibiotika (Connor *et al.*, 1977). Im Jahr 1993 gelang Kende *et al.* die Totalsynthese von Ambruticin. Anfang der neunziger Jahre isolierten Höfle *et. al* aus *Sorangium cellulosum* die stickstoffhaltigen Ambruticine VS-1 bis VS-5 und klärten deren Struktur auf (Höfle *et al.*, 1991; Abb. 2).

Bereits erste Untersuchungen zeigten, dass Ambruticin S gegen eine große Anzahl von pathogenen Pilzen wirksam ist, z. B. *Coccidioides immitis*, *Trichophyton mentagrophytes* (Ringel *et al.*, 1977; Levine *et al.*, 1978; Ringel, 1978). Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten eine Inhibierung der Protein- und RNA-Synthese bei *Microsporum*

R ¹	R ²	Ambruticin	M _G [g/mol]	R ¹	R ²	Ambruticin	M _G [g/mol]
H	OH	S	474,6	H	N(CH ₃) ₃ ⁺	VS-1	516,7
H	NH ₃ ⁺	VS-5	474,7	CH ₃	N(CH ₃) ₃ ⁺	VS-2	530,7
H	NH ₂ (CH ₃) ⁺	VS-4	488,7	H	NOH(CH ₃) ₂ ⁺	VS-3 N-Oxid	518,7
H	NH(CH ₃) ₂ ⁺	VS-3	502,7				

Abb. 2: Strukturformeln und Molgewichte der Ambruticine S und VS (Abbildung von Knauth, 2000). Zur Unterscheidung wurde von Höfle *et al.* (1991) das erste gefundene Ambruticin als Ambruticin S bezeichnet. Die Bezeichnung S (engl. *slow*) und VS (engl. *very slow*) wurden nach dem Laufverhalten bei der Dünnschichtchromatographie gewählt.

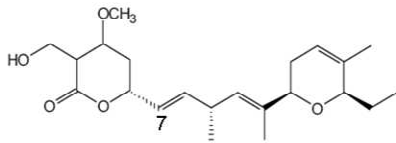
fulvum (Ringel, 1978) bzw. eine reduzierte Aminosäureaufnahme bei *Candida parapsilosis* (Simpkin, 1985).

Die Aktivität von Ambruticin S auf *Candida* scheint allerdings speziesspezifisch zu sein. Während die Substanz auf *C. parapsilosis* einen ausgesprochen starken Effekt besitzt, ist die Wirkung bei *C. albicans* nur marginal (Ringel, 1978).

Auch die Ambruticine VS (außer VS-2) zeigen eine hohe Aktivität gegen Pilze (Höfle *et al.*, 1991). Für ein Derivat von Ambruticin VS-4 (KOSN-2079) wurde nachgewiesen, dass es bei *Aspergillus fumigatus*- und *Coccidioides posadasii*-infizierten Mäusen die Überlebensrate erhöht (Chiang *et al.*, 2006; Shubitz *et al.*, 2006).

Ambruticin S und Ambruticin VS-3 (Abb. 2) verhalten sich in vieler Hinsicht gleich. Beide zeigen einen wirksamen Effekt bei verschiedenen Hefen, Zygomyceten, Oomyceten, Ascomyceten und Deuteromyceten, inklusive wichtiger Pflanzen-, Tier- und Humanpathogene. Beispielsweise reagieren *Neurospora crassa* oder auch *Aspergillus*-Spezies sensitiv auf beide Ambruticine, wohingegen *Saccharomyces cerevisiae* resistent ist (Knauth & Reichenbach, 2000). Eine Kreuz-Resistenz für Ambruticin VS-3 mit Pyrrolnitrin und Jerangolid A wurde beschrieben, was ein gemeinsames Target vermuten lässt (Gerth *et al.*, 1996). Ein intrazellulärer Glycerinanstieg, gefolgt von einer Akkumulation von Triacylglyceriden und freien Fettsäuren, wurde bei *Hansenula anomala* nach Zugabe von Ambruticin VS-3 beobachtet, so dass ein Zusammenhang mit osmoregulierten Systemen vermutet wird (Knauth & Reichenbach, 2000). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Ambruticin VS-3 den osmotischen Stresssignalweg beeinflusst und eine Histidinkinase vom Typ III dabei eine entscheidende Rolle spielt (Vetcher *et al.*, 2007).

Jerangolid A



Ambruticin VS-3

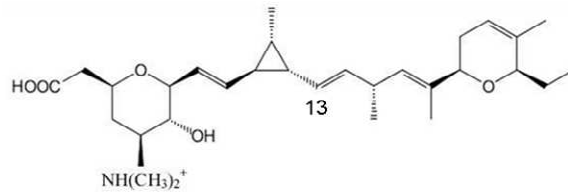


Abb. 3: Strukturformeln von Jerangolid A und Ambruticin VS-3 nach Gerth *et al.* (1996)

1.2.4. Jerangolide

Neben vielen anderen Sekundärmetaboliten, die von Myxobakterien isoliert wurden, wurde Mitte der neunziger Jahre eine neue Substanzgruppe entdeckt: die Jerangolide (Gerth *et al.*, 1996). Von vielen getesteten *Sorangium cellulosum*-Stämmen zeigen drei eine Jerangolid-Produktion. Bislang ist nur wenig über diese Substanzfamilie bekannt. Auffällig unter den Jerangoliden ist Jerangolid A durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Ambruticin VS-3 (Abb. 3). Die Analyse des antimikrobiellen Spektrums von Jerangolid A ergab, dass zahlreiche Hefen und Pilze sensitiv reagieren, hingegen ist keine Auswirkung auf Bakterien feststellbar. Das gleiche Wirkungsspektrum wurde auch für Ambruticin beschrieben (Gerth *et al.*, 1996). Die Wirkung beider Substanzen liegt beispielsweise bei *H. anomala* im gleichen, sehr niedrigen Konzentrationsbereich (0,07 µg/mL für Jerangolid A und 0,03 µg/mL für Ambruticin VS-3; Gerth *et al.*, 1996). Untersuchungen von Jerangolid A bezüglich des Metabolismus von *H. anomala* lassen eine Veränderung der Membranpermeabilität und damit einen Einfluss auf die Membransynthese vermuten (Gerth *et al.*, 1996). Außerdem zeigt eine Ambruticin-resistente Mutante von *H. anomala* eine Kreuz-Resistenz zu Jerangolid A. Eine Jerangolid-resistente Mutante von *Trichosporon terrestre* reagiert nicht auf Ambruticin (Gerth *et al.*, 1996). Diese Übereinstimmungen zwischen Jerangolid A und Ambruticin VS-3 lassen auf einen ähnlichen Wirkmechanismus schließen.

1.2.5. Phenylpyrrole: Pyrrolnitrin und Fludioxonil

Mitte der sechziger Jahre wurde mit Pyrrolnitrin aus *Pseudomonas pyrocinia* ein neues Antibiotikum isoliert, welches bakteriostatische und fungistatische Eigenschaften besitzt (Arima *et al.*, 1964; Arima *et al.*, 1965). Später wurde Pyrrolnitrin auch bei anderen Pseudomonaden (Lively *et al.*, 1966) sowie bei den Myxobakterien *Myxococcus* (Gerth *et al.*, 1982), *Cystobacter* und *Coralloccoccus* (Gerth *et al.*, 1996) gefunden. Pyrrolnitrin

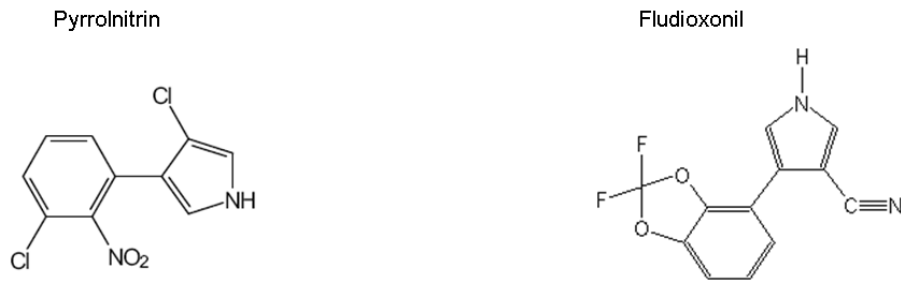


Abb. 4: Strukturformeln von Pyrrolnitrin und Fludioxonil

gehört zur Gruppe der Phenylpyrrole (Abb. 4). Aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit wurden chemische, lichtunempfindliche Derivate wie Fludioxonil hergestellt (Gehmann *et al.*, 1990; Abb. 4). Sie werden bereits in der Landwirtschaft zur Bekämpfung von Pflanzenpathogenen eingesetzt.

Als Grund für die Wachstumshemmung bei *S. cerevisiae* durch Pyrrolnitrin wird eine Inhibierung der Atmungskette vermutet (Tripathi & Gottlieb, 1969). Bei höheren Konzentrationen und längerer Inkubation sind auch die RNA-, DNA- und Proteinsynthese betroffen (Nose & Arima, 1969; Tripathi & Gottlieb, 1969). Später wurde ein Zusammenhang zur Regulation der osmotischen Stressantwort gezeigt (Pillonel & Meyer, 1997). Anhand von Untersuchungen mit Fludioxonil wurde die Hemmung einer Proteinkinase als Wirkort beschrieben, welche in die osmotische Stressantwort involviert ist (Pillonel & Meyer, 1997).

Wie auch bei Ambruticin VS-3 führt die Behandlung mit Pyrrolnitrin zu einem Anstieg von Triacylglyceriden und freien Fettsäuren (Knauth, 2000). Hinzu kommt, dass sowohl Pyrrolnitrin als auch Fludioxonil die Glycerinbiosynthese in *N. crassa* stimulieren (Fujimura *et al.*, 2000). Auch in *C. albicans* wird durch die Behandlung mit Fludioxonil Glycerin akkumuliert (Ochiai *et al.*, 2002).

Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass in geringen Konzentrationen Pyrrolnitrin auf die osmotischen Stressabwehr wirkt und in hohen Dosen die Atmungskette inhibiert (Okada *et al.*, 2005). Als Target dieser Phenylpyrrole wurde eine Histidinkinase Typ III beschrieben. Filamentöse Pilze wie *N. crassa* und *Cochliobolus heterostrophus*, die sensitiv auf diese Substanzen reagieren, werden durch die Deletion der Histidinkinase resistent (Ochiai *et al.*, 2001; Yoshimi *et al.*, 2004). Nach Literaturangaben ist die Histidinkinase Typ III an der Aktivierung der osmotischen Stressabwehr beteiligt (Yoshimi *et al.*, 2005).

1.3. Osmotische Stressabwehr in Hefen

Osmotischer Stress resultiert beispielsweise aus einer hypertonen Umgebung, d.h. die Konzentration von extrazellulären gelösten Stoffen ist höher als die Konzentration der gelösten Stoffe im Zellinneren. Dadurch kommt es zu einem Wasserverlust der Zelle. Um dem entgegenzuwirken, werden in der Zelle sogenannte kompatible Osmolyte gebildet und intrazellulär akkumuliert (Prick, 2006). Solch ein Osmolyt ist Glycerin, dessen Produktion unter osmotischen Stressbedingungen in Hefen durch den HOG-Signalweg reguliert wird (Hohmann, 2002b). Die an diesem Prozess beteiligten Komponenten und Signalwege werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.1. Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme

Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme wurden erstmals für Bakterien beschrieben (Ninfa & Magasanik, 1986; Nixon *et al.*, 1986). Diese Signalwege regulieren eine Vielzahl von Prozessen in Bakterien, z. B. Virulenz, Arzneimittel-Resistenzen, Chemotaxis und Stickstoffassimilation (Bourret *et al.*, 1989; Roychoudhury *et al.*, 1993; Sola-Landa *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2000; Moskowitz *et al.*, 2004). Der Signaltransduktionsmechanismus bei Bakterien umfasst eine membrangebundene Sensor-Histidinkinase, die den Stimulus empfängt, worauf die Kinase einen konservierten Histidin-Rest autophosphoryliert. Das Phosphat wird anschließend auf einen konservierten Aspartat-Rest der sogenannten Receiverdomäne innerhalb des Antwortregulators übertragen. Auf diese Weise wird das Regulatorprotein aktiviert und reguliert schließlich die Genexpression.

Im Gegensatz zu den Bakterien sind die Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme in Hefen komplexer aufgebaut. Die Histidinkinase besitzt neben einer Histidinkinasedomäne auch eine Receiverdomäne (Abb. 5), so dass der Phosphotransfer vom Histidin auf den Aspartat-Rest innerhalb desselben Proteins erfolgt. Aus diesem Grund werden diese Enzyme auch als Hybrid-Histidinkinasen bezeichnet (Ota & Varshavsky, 1993; Posas *et al.*, 1996). Ausgehend von der Histidinkinase erfolgt die Weiterleitung des Signals schließlich durch die Phosphorylierung eines Histidins in einem Phosphotransferprotein. Anschließend wird das Phosphat an einen Aspartat-Rest der Receiverdomäne eines Antwortregulators weitergeben. Somit erfolgt die Übertragung des Phosphats von einem Histidin- auf einen Aspartat-Rest im Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem von Hefen zweimal.

Ein eukaryotisches Zwei-Komponenten-System wurde erstmals bei *S. cerevisiae* entdeckt (Maeda *et al.*, 1994). Dort dient es zur Abwehr von osmotischem Stress, d. h. zur Adaption an variierende osmotische Umgebungsbedingungen. Es besteht aus der Hybrid-Histidinkinase Sln1, dem Phosphotransferprotein Ypd1 und dem Antwortregulator Ssk1 und ist Teil des HOG-Signalweges, der unter osmotischen Stressbedingungen aktiviert wird (Kap. 1.3.2).

Unter normalen Bedingungen ist die Histidinkinase Sln1 aktiv und am Histidinrest phosphoryliert. Von dort wird der Phosphatrest zunächst auf ein Aspartat in der Receiverdomäne und anschließend zum Phosphotransferprotein Ypd1 und zum Antwortregulator Ssk1 übertragen (Chauhan *et al.*, 2006; Abb. 5). Unter osmotischen Stressbedingungen wird die Histidinkinase Sln1 inhibiert, so dass die Autophosphorylierung ausbleibt und auch die nachfolgenden Proteine unphosphoryliert vorliegen (Abb. 5).

Zu allen Komponenten, die aus dem HOG-Signalweg von *S. cerevisiae* bekannt sind, wurden in *C. albicans* die entsprechenden homologen Gene gefunden, so dass von einer prinzipiell ähnlichen Struktur ausgegangen werden kann. Ergänzend dazu besitzt *C. albicans* drei Histidinkinasen Sln1, Chk1 und Nik1/Cos1 (Abb. 6), die wesentliche Bestandteile in Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme sind.

Die Sensor Hybrid-Histidinkinase Sln1 aus *C. albicans* ist homolog zu Sln1 aus

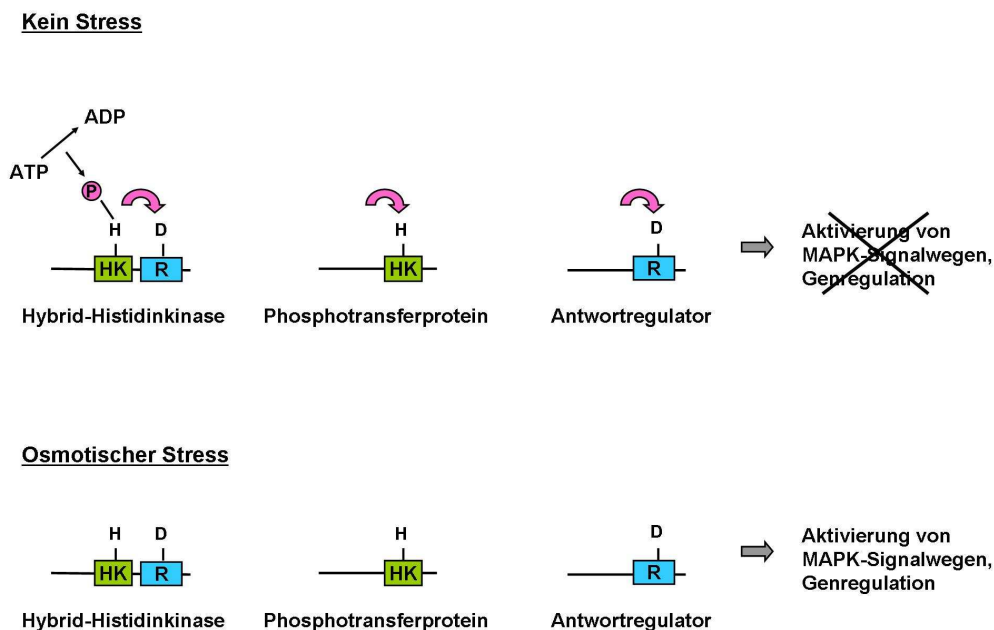


Abb. 5: Zwei-Komponenten-Signaltransduktion in Hefen (modifiziert nach Kruppa & Calderone, 2006), Abkürzungen: HK=Histidinkinase, R=Receiverdomäne, H=Histidinrest, D=Aspartatrest

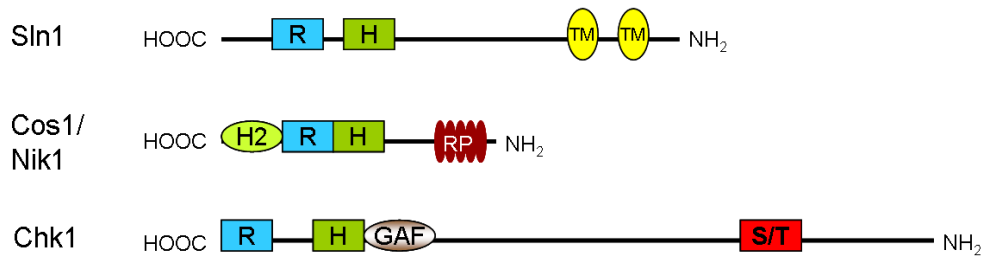


Abb. 6: Histidinkinasen in *C. albicans*: schematische Darstellung nach Santos & Shiozaki (2001) und Kruppa & Calderone (2006); Abkürzungen: TM=Transmembrandomäne, H=Histidinkinasedomäne, R= Receiverdomäne, RP=Wiederholungssequenzen (engl. *repeat sequences*), S/T=Serin-Threonin-Kinasedomäne, GAF=GAF-Domäne (engl. *cGMP-specific and -regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase, Adenyl cyclase, and E. coli transcription factor FhlA*)

S. cerevisiae (Posas *et al.*, 1996; Nagahashi *et al.*, 1998; Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Allerdings ist eine Deletion des Genes *SLN1* bei *S. cerevisiae* letal, wohingegen eine entsprechende *C. albicans*-Mutante lebensfähig ist (Ota & Varshavsky, 1993; Yamada-Okabe *et al.*, 1999).

Die zweite Histidinkinase ist Chk1 (Calera *et al.*, 1998), die bislang in pathogenen Pilzen nur bei *C. albicans* identifiziert wurde. Neben einer Histidinkinase- und einer Receiverdomäne besitzt Chk1 außerdem eine Serin-Threonin-Kinasedomäne und eine GAF-Domäne (Abb. 6), die auf eine mögliche Funktion in MAPK-Wegen (engl. *mitogen activated protein kinase*) bzw. auf die Bindung von Signalmolekülen hindeuten (Kruppa & Calderone, 2006; Martinez *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu *SLN1* konnten bei *CHK1* keine transmembranen Sequenzen ermittelt werden, so dass es sich hierbei vermutlich um ein cytosolisches Protein handelt (Kruppa & Calderone, 2006). Die genaue Funktion von Chk1 ist bislang nicht geklärt, allerdings wurde für eine Deletionsmutante eine deutlich verringerte Virulenz gezeigt, die mit einer Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird (Li *et al.*, 2004). Zusätzlich wird eine Bedeutung im Quorum Sensing (Kruppa & Calderone, 2006) sowie eine Beteiligung an der Zellwandbiosynthese vermutet (Kruppa *et al.*, 2004; Klippel, 2008).

Die dritte Histidinkinase wurde in *C. albicans* in zwei unabhängigen Studien identifiziert und als Nik1 bzw. Cos1 bezeichnet (Alex *et al.*, 1998; Selitrennikoff *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass es sich um ein cytosolisches Protein handelt, da es keine transmembranen Domänen aufweist (Abb. 6). Eine Besonderheit in der Struktur dieser Histidinkinase sind fünf Wiederholungen von je 90 Aminosäuren im N-terminalen Bereich. Aufgrund dieses Charakteristikums gehört Nik1/Cos1 zu den Histidinkinasen Typ III (Yoshimi *et al.*, 2005).

Zudem besitzt die Histidinkinase eine zweite Histidinkinasedomäne (Abb. 6). Die genaue Rolle von Nik1/Cos1 ist noch immer unklar. Durch die Deletion von *NIK1/COS1* wird das Wachstum unter osmotischen Bedingungen nur minimal beeinträchtigt, es zeigt sich jedoch nur eingeschränktes Hyphenwachstum (Alex *et al.*, 1998; Srikantha *et al.*, 1998). Die Herstellung einer Doppel-Deletionsmutante von *NIK1/COS1* und *SLN1* war nicht erfolgreich (Yamada-Okabe *et al.*, 1999), was zur Annahme führt, dass diese doppelte Deletion letal ist und beide Proteine gemeinsam unter anderem die osmotische Adaption regulieren (Kruppa & Calderone, 2006). Da bei einer Deletion von *NIK1/COS1* die Häufigkeit des Wechsels zwischen weißen und opaque Zellen reduziert ist, wird zusätzlich eine Rolle in der Regulation dieses Phänotyps vermutet (Srikantha *et al.*, 1998).

1.3.2. Der HOG-Signalweg in *S. cerevisiae* und *C. albicans*

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ist das Zwei-Komponenten-System ein Bestandteil des HOG-Signalweges, der bei osmotischem Stress aktiviert wird.

Unter normalen Bedingungen ist der Sln1-Ypd1-Ssk1-Weg (Abb. 7) in *S. cerevisiae*

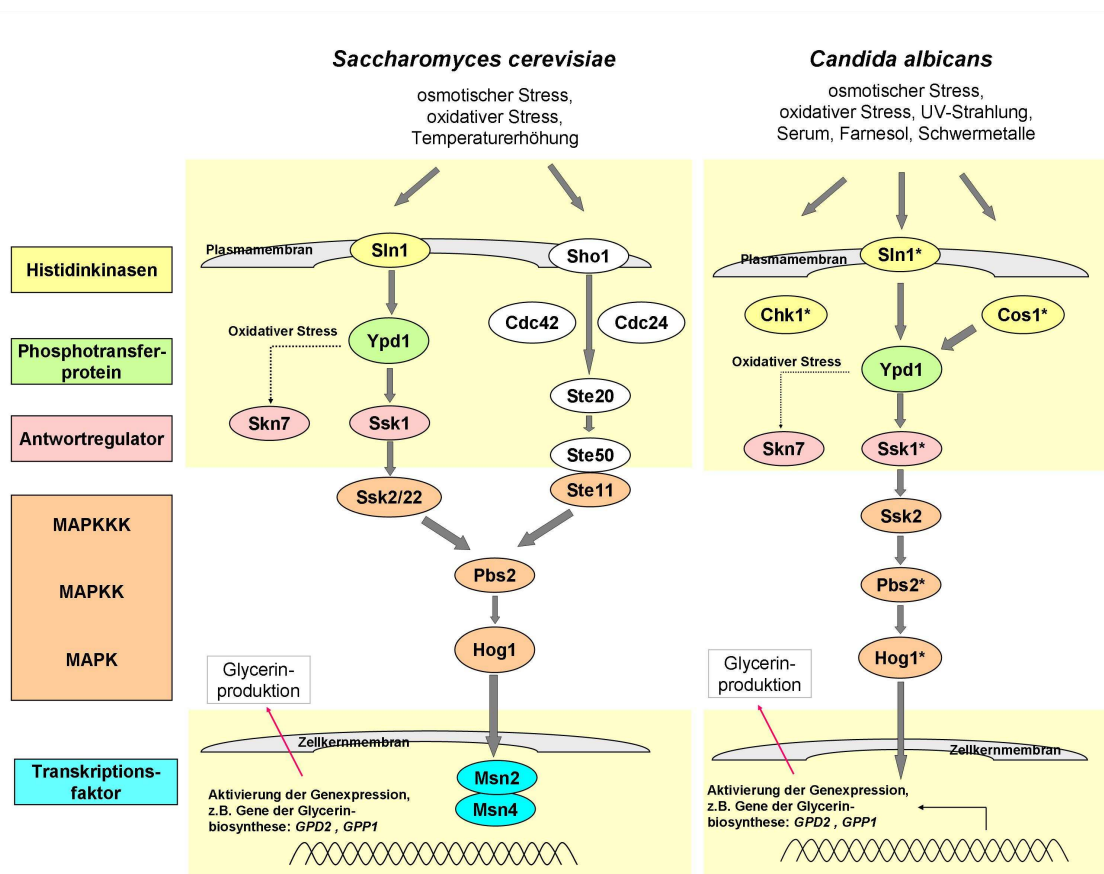


Abb. 7: HOG-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* modifiziert nach Bahn *et al.* (2007); * kennzeichnet Deletionsstämme von *C. albicans*, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

phosphoryliert und die HOG-MAPK-Kaskade inaktiv, wohingegen bei osmotischem Stress die Phosphorylierung ausbleibt (Abb. 5). Dadurch ist eine aktivierende Wechselwirkung des Antwortregulators Ssk1 mit der MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) Ssk2/Ssk22 möglich (Abb. 7). Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAPK-Kinase (MAPKK) Pbs2 und schließlich der MAPK Hog1. Diese gelangt nach der Phosphorylierung in den Zellkern und induziert dort die Expression von Genen. Letztendlich führt dies zu einer Akkumulation von Glycerin in der Zelle, was einer Dehydrierung entgegenwirkt. Außerdem werden durch den HOG-Signalweg die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 aktiviert, welche die Stressantwort in *S. cerevisiae* kontrollieren (Bahn *et al.*, 2007).

Der HOG-Signalweg in *C. albicans* ist in mindestens drei separaten Prozesse involviert: Stressadaptation, Morphogenese sowie Zellwandbildung (Monge *et al.*, 2006). Wie bereits erwähnt, wurden zu allen Komponenten, die aus dem HOG-Signalweg von *S. cerevisiae* bekannt sind, in *C. albicans* die entsprechenden homologen Gene gefunden. Dennoch gibt es Unterschiede zwischen den beiden Hefen. So wird in *C. albicans* neben Glycerin auch D-Arabitol als Antwort auf Stressbedingungen gebildet, was ebenfalls über den HOG-Signalweg reguliert wird (Kayingo & Wong, 2005). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* besitzt *C. albicans* außerdem die Histidinkinase Nik1/Cos1 und Chk1 (Abb. 6).

Wie auch *S. cerevisiae* besitzt *C. albicans* das Sensorprotein Sho1 (Abb. 7), dessen

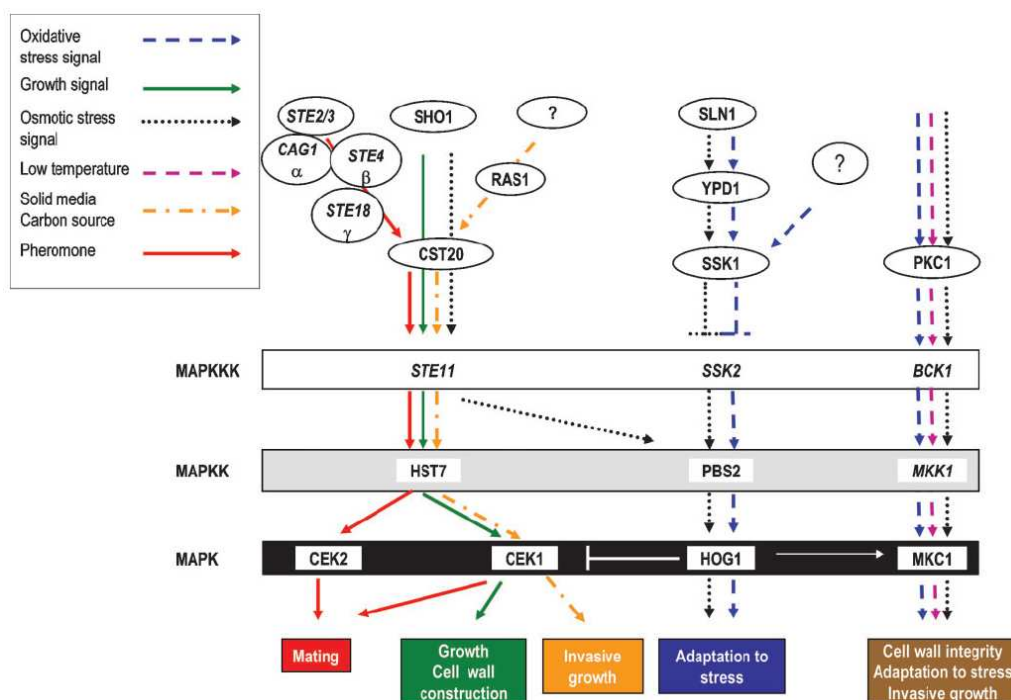


Abb. 8: Schematische Darstellung der Hauptelemente der MAPK-Signaltransduktion in *C. albicans* nach Monge *et al.* (2006).

Funktion sich aber in beiden Organismen unterscheidet. Bei *S. cerevisiae* fungiert Sho1 als zweites Sensorprotein, das ebenfalls das HOG-MAPK-Modul aktiviert, allerdings über die MAPKKK Ste11, die wiederum die MAPKK Pbs2 phosphoryliert (Abb. 7). Hingegen scheint seine Funktion in *C. albicans* HOG-unabhängig, aber essentiell für die Aktivierung des Ste11-Hst7-Cek1-MAPK-Moduls zu sein (Roman *et al.*, 2005; Abb. 8). In *C. albicans* besteht keine Verbindung von Ste11 zu Hog1 (Cheetham *et al.*, 2007), vielmehr führt die Aktivierung der MAPKKK Ste11 zu einer Phosphorylierung der MAPKK Hst7, welche wiederum die MAPK Cek1 phosphoryliert (Csank *et al.*, 1998; Abb. 8). Der Cek1-Signalweg vermittelt unter anderem Morphogenese sowie filamentöses Wachstum und ist zudem an der Konstruktion der Zellwand beteiligt (Csank *et al.*, 1998). Da unter bestimmten Bedingungen die Anwesenheit von Hog1 für die Aktivierung der MAPK Mkc1 des Zellwand-Integrität-Signalweg benötigt wird, scheint eine Verbindung zu dem HOG-Signalweg zu bestehen (Navarro-Garcia *et al.*, 2005; Abb. 8). Der Zellwand-Integrität- bzw. Mkc1-abhängige Signalweg ist in erster Linie in die Zellwandbiosynthese involviert (Navarro-Garcia *et al.*, 1995) und entspricht dem Signalweg der MAPK Mpk1/Slt2 aus *S. cerevisiae*.

1.3.3. Glycerinbiosynthese in Hefen

Glycerin kann von Hefen unter aeroben Bedingungen als Kohlenstoff- und Energie-Lieferant verwertet werden. *Candida utilis* beispielweise nimmt Glycerin aktiv auf und wächst mit Glycerin als Kohlenstoffquelle genauso schnell wie mit Glucose (Reinhardt, 2006). Andererseits ist Glycerin auch ein Bestandteil von Lipiden und eine wichtige Komponente der Zellmembran. Außerdem fungiert Glycerin als osmotische Ausgleichssubstanz und wird unter osmotischen Stressbedingungen hergestellt (Schneider, 2001).

Die Glycerinbiosynthese erfolgt über die Glykolyse, einem katabolischen Stoffwechselprozess, bei dem Glucose und andere organische Nährstoffe abgebaut werden (Campbell, 1998; Abb. 9). Über diverse Zwischenschritte wird Glucose zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt (Abb. 9). Anschließend reduziert die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPD) Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-Phosphat, welches wiederum durch die Glycerin-3-Phosphatase (GPP) dephosphoryliert wird, so dass Glycerin entsteht (Abb. 9).

Neben Ethanol und Kohlendioxid ist Glycerin zudem eines der wichtigsten Produkte der alkoholischen Gärung unter anaeroben Bedingungen (Abb. 9). Dabei können 4 bis 10 %

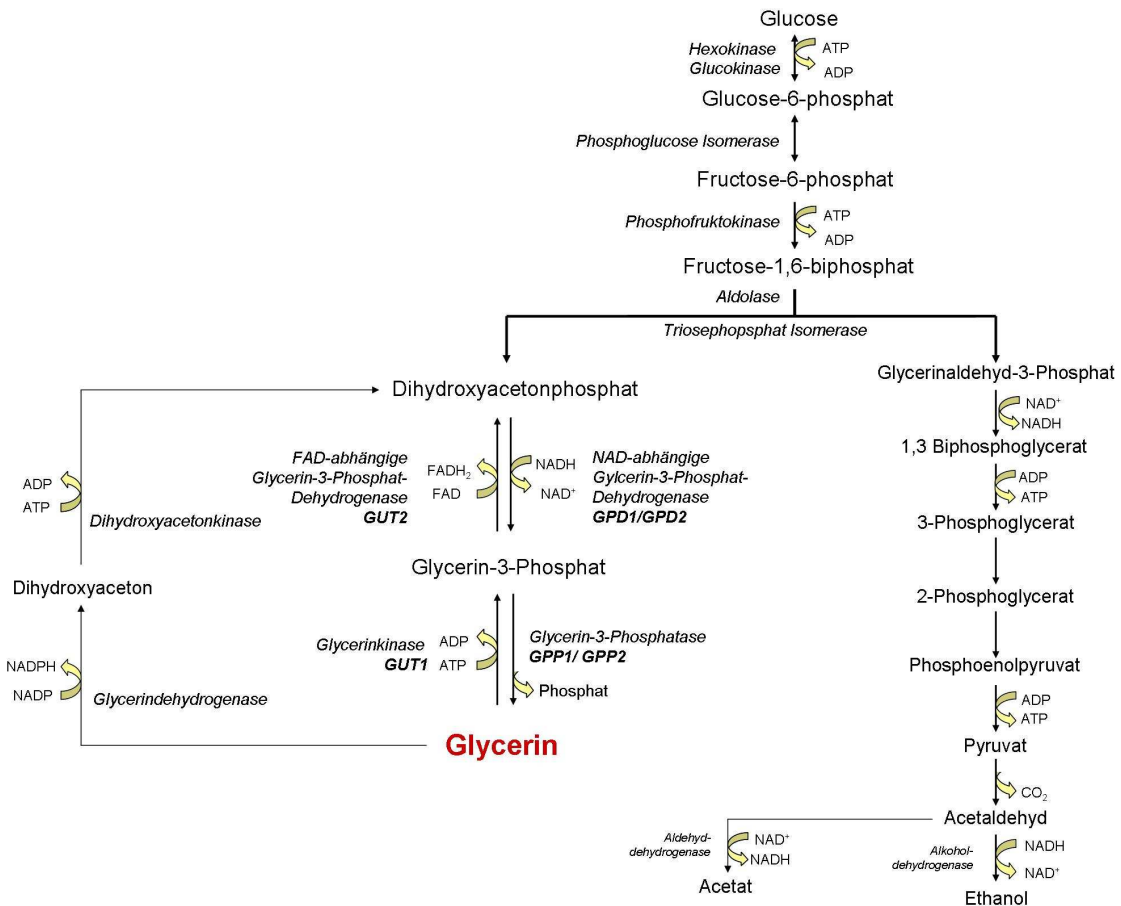


Abb. 9: Wichtige Stoffwechselwege in *S. cerevisiae* nach Nevoigt & Stahl (1997)

der Kohlenstoffquelle zu Glycerin umgewandelt werden (Costenoble *et al.*, 2000), was notwendig ist, um das Redoxgleichgewicht im Cytosol unter Sauerstoffmangel aufrechtzuerhalten. Bei der Produktion von Biomasse entsteht durch oxidative Prozesse NADH, was wiederum unter aeroben Bedingungen in der Atmungskette zu NAD⁺ oxidiert wird. Dabei wird nur wenig Glycerin gebildet. Bei Sauerstoffmangel reicht das durch die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol gebildete NAD⁺ nicht aus, der Überschuss von NADH wird durch die Glycerinbildung reoxidiert (Bro *et al.*, 2004).

S. cerevisiae besitzt für die Enzyme GPD und GPP jeweils zwei Isoformen, die verschiedene physiologische Funktionen übernehmen. So wird die Expression von *GPD2* und *GPP1* unter anaeroben Bedingungen induziert (Ansell *et al.*, 1997; Pahlman *et al.*, 2001), während *GPD1* und *GPP2* vor allem bei der Glycerinproduktion unter osmotischen Stressbedingungen benötigt wird (Ansell *et al.*, 1997; Hohmann, 2002a).

1.4. Zielsetzung

Candida albicans wird als opportunistisches Pathogen bezeichnet, da der Hefepilz einerseits ein Bestandteil der normalen mikrobiellen Flora des Menschen ist, andererseits Infektionen von Haut und Schleimhäuten verursacht. Resistenzen gegenüber herkömmlichen Antimykotika stellen ein Problem in der Behandlung von *Candida*-Infektionen dar, so dass ein zunehmendes Interesse an der Entwicklung von neuen Wirkstoffen besteht.

Da Pilze wie tierische Zellen zu den Eukaryoten gehören, bestehen große Ähnlichkeiten im Aufbau der Zellen, deren Organellen sowie Proteinen oder Proteinkomplexen. Daher sind Zellstrukturen und Proteine aus Pilzen als Angriffspunkte für Antimykotika von besonderem Interesse, die in tierischen Zellen nicht existieren. Beispiele dafür sind die am Aufbau von pilzspezifischen Zellmembranen und Zellwänden beteiligten Proteine (Gozalbo *et al.*, 2004), aber auch Proteine aus Zwei-Komponenten-Signaltransduktionskaskaden, wie Histidinkinasen (Chauhan & Calderone, 2008).

Für Phenylpyrrole (wie Pyrrolnitrin und Fludioxonil), Ambruticine und Jerangolide, die als nicht-zytotoxische mikrobielle Sekundärmetabolite mit fungizider Wirkung entdeckt wurden (Ringel *et al.*, 1977; Höfle *et al.*, 1991), wurde eine Wechselwirkung mit der osmotischen Stressabwehr über eine Histidinkinase postuliert (Pillonel & Meyer, 1997; Vetcher *et al.*, 2007; Dongo *et al.*, 2009). Diese Histidinkinase Typ III wurde als Target für Ambruticin VS-3 und Fludioxonil in Modellorganismen wie *Neurospora crassa* sowie einigen Pflanzenpathogenen identifiziert, jedoch wurde dies noch nicht für human-pathogene Pilze gezeigt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren daher Untersuchungen zur Wirkung der Substanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil auf *Candida albicans*, um zu überprüfen, ob die Histidinkinase Typ III Nik1/Cos1 in dem Humanpathogen ebenfalls das Target der Substanzen ist. Dazu sollte zunächst das Wachstumsverhalten der Hefen unter Einfluss der Substanzen studiert werden. Da die Histidinkinase Typ III Nik1/Cos1 in den HOG-Signalweg involviert ist, sollte Glycerin bestimmt werden, das unter osmotischen Stressbedingungen gebildet wird.

Da Glycerin aber auch bei alkoholischer Gärung und somit bei Abwesenheit von Sauerstoff gebildet wird, sollte durch zusätzliche Untersuchungen von Ethanol sowie des gelösten Sauerstoffs gezeigt werden, dass die Glycerinbildung über den HOG-Signalweg induziert und nicht durch alkoholische Gärung verursacht wird. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Testsubstanzen die Glycerinbiosynthese

induzieren. Daher sollte im weiteren Verlauf die Aktivierung des HOG-Signalweges durch den Phosphorylierungsstatus der MAPK Hog1 nachgewiesen werden. Ergänzend dazu sollten Transkriptionsanalysen durchgeführt werden, um die Regulation von Genen in *C. albicans* unter Substanzeinfluss näher zu charakterisieren, und dadurch Hinweise auf betroffene Signalkaskaden zu erhalten. Des Weiteren sollten in dieser Arbeit die Substanzen in einem in-vitro-Infektionsmodell eingesetzt werden, um zu testen, ob die Pathogenität der Hefe durch die Testsubstanzen beeinflusst werden kann.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Firma</u>
Agilent	2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
Autoklav	Sauter, Tischautoklav (Biomedis)
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus
Bunsenbrenner	Fireboy (IBS Integra Bioscience)
Chip-Scanner	arrayWorX ^c (Applied Prescision Inc.)
Elektroblotapparatur	Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer Cell (Biorad)
Gelelektrophoresekammer	Criterion™ Cell (Biorad)
Gelkassetten	Criterion™ Cassettes, 18Well (Biorad)
Hybridisierungsstation	Lucidea Slidepro (Amersham Bioscience)
Kamera	Arraybooster (Sunergia Medical Inc.) CCD Kamera; LAS-3000 (Fujifilm) Transilluminator (Weisslicht), E.A.S.Y Win 32 (Herolab)
Magnetrührer	MR 2002 (Heidolph)
Mikroskop	Fluoreszenzmikroskop CKX41 (Olympus) Mikroskop (Olympus) Mikroskop (Zeiss)
Mikrotiterplattenreader	µ-Quant Spektralphotometer (BioTek) Cytofluor Multi-Well Plate Reader series 4000 (PerSeptive Biosystems)
Mini-Dismembrator U	B. Braun Biotech
Netzgeräte	Stromquelle Power PAC 300 (Biorad) Stromquelle Power PAC 1000 (Biorad)
pH-Meter (pH211)	HANNAH Instruments
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf)
Pipetten	Easypet-Pipettboy (Eppendorf) Research Pipette Mehrkanal (8er) variabel: 10-100 µL (Eppendorf) Research Pipette Mehrkanal (8er) variabel: 30-300 µL (Eppendorf) Research Pipette variabel: 0,1-2,5 µL (Eppendorf) Research Pipette variabel: 0,5-10 µL (Eppendorf) Research Pipette variabel: 10-100 µL (Eppendorf) Research Pipette variabel: 20-200 µL (Eppendorf) Transferpipette-8er variabel: 10-100µL (Brand)
SpeedVac®	Savant
Schüttler	Rundschüttelmaschine Pilot-Shake® (System Kühner) Schüttler Titamax 1000 (Heidolph) Wippschüttler Mischer Reax3 (Heidolph) Wippschüttler WS5 (Bühler)
Sterile Werkbank	Clean bench (Heraeus)
Thermocycler	T3 Thermocycler (Biometra®)

Thermomixer	Thermomixer 5437 (Eppendorf)
Vakuumpumpe	Vakuumpumpstand Anlage (Vacuubrand)
Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
	Turbomix™ Vortexaufsatz (Scientific Industries)
Waage	Analysenwaage (Sartorius)
	Waage PC4400 (Mettler)
Wasseraufbereitung	Milli Q, Water Purification System (Millipore)
Zentrifugen	Biofuge fresco (Heraeus)
	Megafuge 1.0 (Heraeus)
	Zentrifuge 5402; Rotor F45-18-11 (Eppendorf)
	Zentrifuge 5804 R; Rotor F45-30-11, F34-6-38 (Eppendorf)

2.1.2. Mikrotiterplatten

Normalvolumige 96Well-Mikrotiterplatten (absolutes Well Volumen 300 µL):

transparent	BD Falcon
Oxoplates	OP96C, OP96U PreSens

Volumenreduzierte 96Well-Mikrotiterplatten (absolutes Well Volumen 200 µL)

transparent	Corning
-------------	---------

2.1.3. Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien und Enzyme, sofern nicht anders vermerkt, wurden von den Firmen Sigma, Gibco, Roth, Biorad, Qiagen, Merck, Biomol und J.T. Baker bezogen. Die Puffer und Lösungen wurden in MilliQ-Wasser angesetzt.

2.1.4. Substanzen

Ambruticin VS-3, Jerangolid A, Myxothiazol sowie Pyrrolnitrin wurden bereitgestellt von B. Kunze (Arbeitsgruppe KOM, Helmholtz-Zentrum für Infektionsbiologie, Braunschweig), K. Gerth, H. Steinmetz und R. Jansen (Arbeitsgruppe: Mikrobielle Wirkstoffe, Helmholtz-Zentrum für Infektionsbiologie, Braunschweig). Fludioxonil wurde kommerziell bei Sigma (Riedel-de Haen) erworben. Alle Substanzen besitzen eine geringe Löslichkeit in Wasser, daher wurde als Lösungsmittel Methanol verwendet und diente bei allen Untersuchungen als Kontrolle.

2.1.5. Medien und Agarnährböden

YPD:	Vollmedium für Hefen	
	Hefeextrakt	1 %
	Bakteriologisches Pepton	2 %
	Glucose	2 %

Das YPD-Medium von Sigma wurde als Vollmedium in einer Konzentration von 50 g/L in destillierten H₂O angesetzt und autoklaviert.

YPD-Agar:	Vollmedium für Hefen	
	Hefeextrakt	1 %
	Bakteriologisches Pepton	2 %
	Glucose	2 %
	Agar	1,5 %

Der YPD-Agar wurde bei der Firma Sigma erworben, mit 65 g/L in destillierten H₂O angesetzt und autoklaviert.

90er Medium:	Vollmedium für filamentöse Pilze	
	Malzextrakt	30g/L
	Pepton	3g/L
	Agar	15g/L

Das Vollmedium wurde in einem Liter destillierten Wasser angesetzt (pH 5,6) und autoklaviert.

DMEM:	Zellkulturmedium	
	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Lonza
	FBS	Lonza
	Penicillin/Streptomycin (10000 U/mL/10 mg/mL)	Sigma

Unter sterilen Bedingungen wurden zu 500 mL DMEM 50 mL FBS sowie 5 mL Penicillin/Streptomycin hinzugegeben und als Zellkulturmedium verwendet.

2.1.6. Antikörper

Tab. 1: Verwendete Antikörper

Name	Quelle	Art	Verdünnung	Firma
<i>Primäre Antikörper</i>				
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology®
Anti-Hog1 (y-215)	Kaninchen	polyklonal	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Actin (20-33) IgG	Kaninchen	polyklonal	1:5000	Sigma
<i>Sekundäre Antikörper</i>				
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked	Esel	polyklonal	1:6666	Amersham Biosciences

2.1.7. Hefen, filamentöse Pilze und Zellkultur

Tab. 2: *C. albicans*-Stämme und Mutanten

Stamm	Mutation	Genotyp	Referenz
CAF2-1		$\Delta ura3::imm434/URA3$	Fonzi & Irwin, (1993)
CNC13	$\Delta hog1$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta his1::hisG/\Delta his1::hisG hog1::hisG-URA3-hisG/hog1::hisG$	San José <i>et al.</i> (1996)
BRD3	$\Delta pbs2$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta his1::hisG/\Delta his1::hisG \Delta pbs2::cat/\Delta pbs2::cat-URA3-cat$	Arana <i>et al.</i> (2005)
CSSK21	$\Delta ssk1$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta ssk1::hisG/\Delta ssk1::hisG-URA3-hisG$	Calera <i>et al.</i> (2000)
CaSLN1	$\Delta sln1$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta casln1::hisG/\Delta casln1::hisG-URA3-hisG$	Nagahashi <i>et al.</i> (1998)
CHK21	$\Delta chk1$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta cahk1::hisG/\Delta cahk1::hisG-URA3-hisG$	Calera & Calderone (1999)
LAC17	$\Delta cos1$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta cos1::hisG/\Delta cos1::hisG-URA3-hisG$	Alex <i>et al.</i> (1998)
CM02	$\Delta sit4$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta his1::hisG/\Delta his1::hisG \Delta sit4::HIS1/\Delta sit4::URA3$	Lee <i>et al.</i> (2004)
JF34	$\Delta gpp1$	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta his1::hisG/\Delta his1::hisG \Delta gpp1::HIS1/\Delta gpp1::URA3-dpl200$	Fan <i>et al.</i> (2005)
1386			DSM1386

Tab. 3: Filamentöse Pilze

Pilzstamm	Referenz
<i>Ustilago zeae</i>	DSM3121
<i>Trichoderma koningii</i>	DSM63060
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM905
<i>Pythium debaryanum</i>	DSM62946
<i>Aspergillus nidulans</i>	DSM969
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DSM819
<i>Aspergillus niger</i>	DSM823

Die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Bestimmung der optischen Dichte

Das Hefenwachstum wurde mit dem μ Quant in 96Well-Mikrotiterplatten bei einer optischen Dichte (OD) von 620 nm in einem Volumen von 200 μ L im Doppelansatz vermessen. Als Blindprobe diente das jeweilige Medium.

2.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer (improved) Zählkammer bestimmt. Die Kammertiefe betrug 0,1 mm und die Fläche eines Kleinquadrats 0,0025 mm².

Zur Bestimmung der Zellzahl von Hefen wurden 5 Kleinquadrate gezählt und nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl/mL} = \text{Zellzahl} \times 5 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Zellzahlbestimmung der Zelllinie RAW264.7 wurden mit der gleichen Zählkammer 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro mL wie folgt errechnet:

$$\text{Zellzahl/mL} = (\text{Zellzahl}/4) \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.3. Kultivierung von *C. albicans*

2.2.3.1. Kultivierung in Kolben

Von allen Hefestämmen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden die Hefen in YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C bei 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in 1 mL Ansätzen portioniert, bei -80°C eingefroren und gelagert. Alle folgenden Ansätze wurden bei 30°C auf der Rundschüttelmaschine bei 160 rpm inkubiert.

Die Kultivierung der Hefen erfolgte in einem Volumen von 20 mL YPD-Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben oder in einem Volumen von 50 mL YPD-Medium in 250 mL Erlenmeyerkolben. Das allgemeine Verfahren begann mit dem Animpfen einer Übernachtskultur. Dazu wurde eine 1 mL Gefrierkultur bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend in 20 mL YPD-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die OD_{620nm} der Übernachtskultur bestimmt und eine Vorkultur mit einer Start-OD_{620nm} von 0,2 angesetzt. Die Vorkultur wurde bis zu einer OD_{620nm} von 0,6–0,8 inkubiert. Nach erneuter Verdünnung der Vorkultur auf eine OD_{620nm} von 0,2 wurde so die Hauptkultur angeimpft. Die Hauptkultur unterlag verschiedenen Behandlungen. Zum Ansatz jeder Hauptkultur

wurden die zu testenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und das Experiment gestartet, dabei variierten die Kultivierungszeiten und Probennahmen.

2.2.3.2. Kultivierung in 96Well-Mikrotiterplatten

Für die Kultivierung der Hefen in 96Well-Mikrotiterplatten wurde eine Übernachtskultur angesetzt (Kap. 2.2.3.1). Nach ungefähr 18 Stunden wurde die OD_{620nm} der Übernachtskultur bestimmt und auf eine OD_{620nm} von ca. 0,05 mit YPD-Medium verdünnt. Zunächst wurde die Mikrotiterplatte mit 60 μ L Medium belegt. Anschließend wurde in die erste Reihe 30 μ L der gewünschten Substanz (Stammlösung: 1 mg/mL) gegeben und gemischt, Methanol diente dabei als Kontrolle. Danach wurde aus der ersten Reihe 30 μ L entnommen und in die zweite Reihe überführt. Dieser Prozess setzte sich fort bis zur Reihe 7, so dass jeweils eine 1:3 Verdünnung erzielt wurde. Die letzte Reihe blieb unbeeinflusst und diente als Blindwert. Zu den Verdünnungen wurden 120 μ L der Kultur mit der oben aufgeführten OD_{620nm} gegeben und in die letzte Reihe wurden 120 μ L Medium pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden bei 30°C und 600 rpm auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert. Die OD_{620nm} wurde nach verschiedenen Zeitpunkten im μ Quant gemessen.

2.2.3.3. Agar-Diffusionstest

Bei einem Agar-Diffusionstest (auch Plättchentest genannt) handelt es sich um einen Schnelltest, der zu einer qualitativen Aussage über Wachstumseinflüsse von Substanzen auf diverse Mikroorganismen führt. Die Mikroorganismen werden in Agarnährböden eingebettet und ein Substanz-tragendes Plättchen (Filterpapierscheibchen) auf der Oberfläche positioniert. Die Substanz diffundiert vom Plättchen in den Agarnährboden und kommt somit in Kontakt mit den Mikroorganismen. Bei einer Wachstumshemmung bilden sich um das Plättchen sog. Hemmhöfe, die in ihrer Größe, abhängig von der Wirksamkeit der Substanz, variieren.

Zur Durchführung dieses Tests wurde YPD-Agar bzw. 90er-Medium-Agar in der Mikrowelle verflüssigt. In 15-20 mL handwarmen Agar wurde die Übernachtskultur (siehe Kap. 2.2.3.1) mit einer OD_{620nm} von 0,1-0,2 angeimpft, bei filamentösen Pilzen wurde 1 mL einer Sporensuspension hinzugegeben und in eine Petrischale gegossen. Nachdem der Ansatz ausgehärtet war, wurden mit Substanz getränkte Antibiotika-Plättchen auf die Agaroberfläche gelegt (10 μ L Substanz von einer Stammlösung von 1 mg/mL). Die Petrischalen wurden bei 30°C über Nacht inkubiert. Nach ca. 24 Stunden wurden die Ansätze kontrolliert, die entstandenen Hemmhof-Durchmesser vermessen und die Platten fotografiert. Als Kontrolle diente jeweils das Lösungsmittel der Substanzen.

2.2.3.4. Wachstum auf Agar

Ein weiterer Wachstumstest wurde mit bereits quantifizierten Substanz-Konzentrationen durchgeführt. Die Substanzen wurden in diesem Fall zum flüssigen, handwarmen Agar hinzugegeben und in Petrischalen gegossen. Die Hefen einer Übernachtskultur wurden gezählt und eine Verdünnungsreihe (1:10 Verdünnungen) von 10^6 - 10^1 Zellen/mL ange-setzt. Nach Aushärtung des Agars wurden 10 μ L der Verdünnungsreihe auf den Agar gegeben und bei 30°C inkubiert. Das Wachstum wurde über mehrere Tage beobachtet und die Platten fotografiert.

2.2.4. Sauerstoffmessung

Die Bestimmung des Sauerstoffs erfolgte mit 96Well-Oxoplaten. Das Prinzip basiert auf zwei Fluoreszenzfarbstoffen, einen Indikator-Fluoreszenzfarbstoff (I_{ind}), welcher sauerstoffabhängig ist und einem Referenz-Fluoreszenzfarbstoff (I_{ref}), der als Referenzsignal dient. Beide Farbstoffe befanden sich im Boden der Oxoplaten, weshalb die Messung an der Unterseite der Platte erfolgte. Die Fluoreszenz des Indikator-Farbstoffs hatte eine Anregungswellenlänge von 530 nm und eine Emissionswellenlänge von 620 nm. Der Referenzfarbstoff besaß eine Anregungswellenlänge 530 nm und eine Emissionswellenlänge von 590 nm. Die Messungen erfolgten mit dem Fluoreszenzmessgerät CytoFluor und die resultierenden Intensitäten wurden nach folgender Formel ins Verhältnis (I_R) gesetzt:

$$I_R = I_{ind} / I_{ref}$$

Zum Kalibrieren wurde stark geschütteltes Wasser (k_{100} = 100% Sauerstoff) sowie eine Na_2SO_3 Lösung (10 g/L; k_0 = 0% Sauerstoff) verwendet. Die Konzentration des Sauerstoffes wurde nach folgender Formel ermittelt (Protokoll des Herstellers PreSens):

$$pO_2 = [100 \times (k_0 / I_R) / (I_R - 1)] / [(k_0 / I_R) / (k_{100} / I_R - 1)]$$

Der Ansatz der Hefen für diese Messungen war identisch mit der Kultivierung in 96Well-Mikrotiterplatten siehe Kap. 2.2.3.2.

2.2.5. Glycerinbestimmung im Medium

Die Glycerinbestimmung im Medium basiert auf einer enzymatischen Reaktion. Dabei wird mittels Glycerindehydrogenase Glycerin zu Dihydroxyaceton oxidiert und NAD^+ zu NADH reduziert:



Bei dieser Reaktion wird pro Mol Glycerin ein Mol NAD^+ zu NADH reduziert, was photometrisch bei 340 nm bestimmt werden kann.

Die Kultivierung erfolgte wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben. Die Probennahme erfolgte stündlich über einen Zeitraum von fünf Stunden. Dabei wurden 200 μL Kultur in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, um die Zellen vom Medium zu trennen. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert, die Probe in flüssigen Stickstoff schockgefroren und dann bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Bei jeder Probennahme wurde zusätzlich die $\text{OD}_{620\text{nm}}$ der Kultur gemessen (Kap. 2.2.1).

Bei der Bestimmung von extrazellulärem Glycerin wurden transparente, volumenreduzierte 96Well-Mikrotiterplatten verwendet und die Proben in vier Parallelansätzen vermessen. Der Ansatz pro Well besaß ein Gesamtvolumen von 50 μL , bestehend aus 5 μL Probe und 45 μL Enzymmix, der sich wie folgt zusammensetzte:

93,3 %	(v/v)	100 mM NaCl/100 mM Glycin Puffer, pH 10,5
4,4 %	(v/v)	NAD^+ -Lösung (30 mg/mL in MilliQ H_2O)
2,2 %	(v/v)	Glycerindehydrogenase (0,3 U/ μL in MilliQ H_2O)

Für jede Analyse wurde der Enzymmix frisch zusammengestellt. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von 0-10 mM Glycerin in YPD-Medium angesetzt. Für die Auswertung wurde die Messung des Zeitpunkts 0h als Blindwert gewählt, um zum einen den Effekt des YPD-Mediums und zum anderen des eventuell übertragenden Glycerins aus der Vorkultur zu eliminieren. Bei der Durchführung wurde die Probe vorgelegt und durch Zugabe des Enzymmix die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Platten bei $\text{OD}_{340\text{nm}}$ im μQuant vermessen.

2.2.6. Ethanolbestimmung im Medium

Zur Bestimmung des Ethanols im Medium wurde ebenfalls eine enzymatische Reaktion genutzt, bei der Ethanol mittels Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd oxidiert und NAD^+ zu NADH reduziert wird. Wie auch bei der Glycerinbestimmung (Kap. 2.2.5) wird pro Mol Ethanol ein Mol NAD^+ zu NADH reduziert und kann photometrisch bei einer $\text{OD}_{340\text{nm}}$ vermessen werden. Die Kultivierung und die Probenahme wurden wie in Kap. 2.2.3.1 und Kap. 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung des Ethanols wurden transparente, volumenreduzierte 96Well-Mikrotiterplatten verwendet und die Proben jeweils in vier Parallelansätzen vermessen. Der Ansatz pro Well besaß ein Gesamtvolumen von 50 μL , bestehend aus 5 μL Probe und 45 μL Enzymmix, der folgende Komponenten enthielt:

44,7 μL	NAD-Lösung (11 mM gelöst in 100 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, pH 8,5)
0,3 μL	Alkoholdehydrogenase (3 U/ μL gelöst in 100 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, pH 7,5)

Der Enzymmix wurde immer frisch angesetzt. Für die Kalibrierung wurde eine Standardreihe von 0-100 mM Ethanol in YPD-Medium angesetzt. Für die Auswertung wurde der Blindwert wie in Kap. 2.2.5 beschrieben ermittelt. Beim Ansatz wurden 5 μL Probe vorgelegt und mit Zugabe des Enzymmix die Reaktion gestartet. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe anschließend bei $\text{OD}_{340\text{nm}}$ im μQuant vermessen.

2.2.7. Proteinanalytik

2.2.7.1. Präparation der Zellextrakte

Die Kultivierung erfolgte wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben. Für jede Behandlung wurde ein Erlenmeyerkolben mit Hefen angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen geerntet.

Probennahme und Zellaufschluss I.

Für diese Zellernte (in Anlehnung an Martin *et al.*, 2000 und Navarro-Garcia *et al.*, 2005) wurde die Kultur (Stamm CAF2-1, $\Delta hog1$, $\Delta cos1$) in eisgefüllte 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und 10 min bei 4°C bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Hefen wurden mit 1 mL eiskalten H_2O in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert und erneut pelletiert. Der Aufschluss des Pellets erfolgte mit Hilfe von 120 μL eiskaltem Lysepuffer (Tab. 4) sowie einem Spatellöffel Glasperlen (425-600 μm , Sigma) und einer

Glasperle (2,85-3,3 mm, Roth). Die Proben wurden für eine Stunde bei 4°C gevortext, dann 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um Reste von Zelltrümmern zu entfernen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde bestimmt (siehe Kap. 2.2.7.2.).

Tab. 4: Rezept für Lysepuffer nach Martin *et al.* (2000)

Tris HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
NaF	50 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Beta-Glycerin Phosphat	5 mM
Dinatrium Pyrophosphat	5 mM
EDTA	5 mM
Glycerin	10%
Triton X-100	1%
SDS	0,1%

Zusätzlich wurden in 10 mL Lysepuffer je 1 Tablette des Protease Inhibitor Cocktails (Roche) sowie des Phosphatase Inhibitor Cocktails (Roche) gelöst.

Probennahme und Zellaufschluss II.

Bei dieser Zellernte (Stamm 1386) wurde der Kolbeninhalt in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und bei Raumtemperatur für 3 min bei 3000xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und das Pellet im Restmedium resuspendiert. Das gelöste Pellet wurde in flüssigen Stickstoff getropft und die entstandenen Zellperlen bei -80°C gelagert. Zum Zellaufschluss wurde ein 5 mL Teflonbehälter in Kombination mit einer Wolframkarbidkugel benutzt, die zwischen den jeweiligen Schritten in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Die Zellperlen wurden in den Teflonbehälter mit einer Wolframkarbidkugel gegeben, in den Minidismembrator eingespannt und 2 min bei 2000 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Behälter wiederholt gekühlt und das entstandene Zellpulver in 100 µL Lysepuffer überführt. Das Pulver wurde gevortext und auf Eis gelagert bis alle Proben aufschlossen waren. Bevor der nächste Zellaufschluss durchgeführt wurde, wurden der Teflonbehälter und die Wolframkarbidkugel für 10 min in

0,5 %iger Natriumhypochloridlösung und anschließend in 70 %igem Ethanol gereinigt. Nach dem Trocknen der Materialien wurde die Prozedur mit der nächste Probe durchgeführt. Nach Aufschluss aller Proben, wurden diese für 5 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und die Proteinbestimmung wie in Kap. 2.2.7.2 durchgeführt.

2.2.7.2. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung für Proteine wurde der BCA Assay (Smith *et al.*, 1985) verwendet. Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ . Das BCA (Bichinolin-4-Carbonsäure) reagiert wiederum mit Cu^+ , wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^+ - Ion bilden.

BCA Reagenz A:

10 g/L BCA
17,1 g/L Na_2CO_3
1,9 g/L $\text{Na}_2\text{Tartrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
9,5 g/L NaHCO_3 (pH 11,25 eingestellt mit NaOH)

BCA Reagenz B:

40 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

Als Proteinstandard diente Lysozym (10 mg/L gelöst in MilliQ H_2O).

Für den Ansatz wurden transparente, normalvolumige 96Well-Mikrotiterplatten verwendet. Die Proben wurden jeweils in Doppelansätzen vermessen. Zunächst wurden die Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt und 100 μL dieser Lösung in die Mikrotiterplatte vorgelegt. In die erste Reihe wurde anschließend nochmals 100 μL derselben Lösung gegeben. Danach wurden 5 μL Probe/Standard in die erste Reihe pipettiert. Mittels Mehrkanalpipette wurde aus der ersten Reihe 100 μL herausgenommen und in die zweite Reihe überführt. Dies wurde bis zur letzten Reihe fortgesetzt und somit wurde jeweils eine 1:1 Verdünnung erzielt. Die restlichen 100 μL der letzten Reihe wurden verworfen. Die Platte wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei $\text{OD}_{570\text{nm}}$ vermessen. Als Blindwert diente der Lysepuffer.

2.2.7.3. Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Das Proteingemisch der einzelnen Proben wurde so mit Lysepuffer verdünnt, dass in 10 μL Volumen der Proben jeweils der gleiche Proteingehalt vorlag. Zu dieser 10 μL -Proteinlösung wurden 10 μL Probenpuffer (Laemmli Puffer und 2-Mercaptoethanol, 19:1 v/v) hinzugegeben und 10 min bei 95°C auf dem Thermomixer erhitzt. Dabei wurden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine zerstört. Anschließend wurde das entstandene Kondenswasser kurz herunter zentrifugiert. Pro Geltasche wurden 20 μL Probe aufgetra-

gen und 10 µL vom Protein-Größenstandard (Biorad) in eine separate Geltasche gegeben, der ohne weitere Vorbereitung direkt eingesetzt werden konnte.

2.2.7.4. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophorese wurden fertige Gelkassetten (Biorad) verwendet. Das Trenngel (12,5 %) wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

Acrylamid Lösung	4,1 mL
Lower Tris (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5 mL
destilliertes H ₂ O	3,2 mL
20 % (w/v) SDS	50 µL
10 % (w/v) APS	50 µL
TEMED	8 µL

Das Trenngel wurde in eine Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem es polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (4 %) wie folgt vorbereitet:

Acrylamid Lösung	670 µL
Upper Tris (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,25 mL
destilliertes H ₂ O	3,1 mL
20 % (w/v) SDS	25 µL
10 % (w/v) APS	25 µL
TEMED	5 µL
Bromphenolblau 0,05 %	25 µL

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Taschenbildung eingesteckt. Nach ca. 45 min war das Sammelgel polymerisiert und die Gelkassette konnte in der Elektrophoresekammer verwendet werden. Die Gelkammer wurde mit TGS- (Tris/Glycin/SDS) Puffer (Biorad) gefüllt und die Proteinproben (Vorbereitung siehe Kap. 2.2.7.3) in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese verlief zunächst bei einer Spannung von 80 V für ca. 45 min und anschließend für weitere 75 min bei 120 V. Während der Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Zugabe von SDS wurden die Eigenladungen der Proteine überlagert und eine Auftrennung nach Ladung eliminiert.

2.2.7.5. Western-Blot Analyse

Beim „Western Blotting“ werden die zuvor durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um sie dort mit Hilfe von Antikörpern identifizieren zu können (Towbin *et al.*, 1979).

Tab. 5: Blotpuffer und TBS-T Puffer

Blotpuffer		TBS-T Puffer	
Tris	25 mM	Tris-HCl	20 mmol/L
Glycin	192 mM	NaCl	140 mmol/L
Methanol	10 % (v/v)	Tween 20	0,1 % (v/v)
10% (w/v) SDS-Lösung	3,75 mL	pH	7,4

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Kassette entnommen und für 30 min in Blotpuffer (Tab. 5) equilibriert. Eine PVDF-Membran (Biorad) sowie Filterpapier (Biorad) wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde zum Benetzen in Methanol geschwenkt, anschließend mit Wasser gespült und ebenso in Blotpuffer equilibriert. Für das Blotten wurde eine Semi-Dry Blotkammer verwendet und wie folgt zusammengebaut:

- 3 Filterpapiere in Blotpuffer anfeuchten und aufeinander auf die Anode legen
- Membran auflegen
- Gel auflegen
- 3 Filterpapiere in Blotpuffer anfeuchten und aufeinander auf das Gel legen
- Kathode auflegen

Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke 250 mA für eine Stunde.

2.2.7.6. Immundetektion

Nach Beenden des Proteintransfers wurde die Membran 5 min in TBS-T Puffer gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran mit Blockpuffer (5% Milchpulver gelöst in TBS-T Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach 4 x 10 min Waschen der Membran mit TBS-T Puffer, wurde diese mit dem Primärantikörper (Tab. 1), der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war, bei 4°C über Nacht inkubiert (schwenkend). Nach ca. 18 Stunden wurde die Membran 4 x 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Tab. 1) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Dieser war gegen den primären Antikörper gerichtet. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, um die Peroxidase-Aktivität zu schützen. Anschließend wurde der Blot erneut 4 x 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Die Antikörper wurden mit 5 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in TBS-T Puffer, verdünnt (siehe Kap. 2.1.6). Durch die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase wurde das zugegebene Luminol (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit, Amersham) umgesetzt und die entstandene Chemolumineszenz wurde mit einer CCD Kamera (LAS 3000, Fujifilm) detektiert.

2.2.7.7. Entfernen der Antikörper von der Membran

Nach einer Chemolumineszenz-Detektion ist es möglich, die Antikörper von der Membran zu entfernen, das sog. Strippen, und mit weiteren Antikörpern zu inkubieren, um weitere Proteine nachzuweisen. Die Membran wurde dafür 2 x 5 min mit TBS-T gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur mit der Stripplösung (Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution, Chemicon®) auf dem Wippschüttler inkubiert. Bei mehrmaligen Strippen verlängerte sich die Inkubationszeit um jeweils 10 min. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min mit TBS-T gewaschen und geblockt. Der weitere Verlauf ist in Kap. 2.2.7.6 beschrieben.

2.2.8. Transkriptionsanalysen

Zur Untersuchung der Genexpression in *C. albicans* wurden Microarrays (DNA-Chips) verwendet. Das Prinzip dieser Methode liegt im Nachweis von mRNA. Dafür wurden Nukleinsäuren (Oligonukleotide), die als Sonden dienten, auf einem Festmedium an definierten Positionen eines Rasters immobilisiert. Die isolierte mRNA (Kap. 2.2.8.3) wurde in zwei Schritten zunächst in cDNA und dann in cRNA umgeschrieben, wo im zweiten Schritt die cRNA markiert wurde (Kap. 2.2.8.4, 2.2.8.5). In diesem Fall wurde zur Markierung Biotin verwendet. Die markierte cRNA wurde anschließend mit den Microarrays hybridisiert, so dass die zu den Sonden komplementäre cRNA binden konnte. Nach Entfernen nicht gebundener cRNA wurde der DNA-Chip zur Detektion des Markers Biotin mit einem Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-Konjugat inkubiert. Nach Abwaschen von überschüssigem Konjugat konnten die Fluoreszenzsignale mit einem Array Scanner erfasst (Kap. 2.2.8.6) und ausgewertet werden (Kap. 2.2.8.7). Die resultierenden Signalintensitäten demonstrierten die Aktivität der Gene. Beispielsweise führt ein hoch transkribiertes Gen zu einer höheren Anzahl an mRNA in der Zelle und erzeugt folglich ein höheres Signal auf dem Chip als ein schwach transkribiertes Gen. Für die Vergleichsanalyse von Substanz-behandelten mit Methanol-behandelten Hefestämmen (Lösungsmittelkontrolle) wurden sowohl *C. albicans* DNA-Chips mit ausgewählten Oligonukleotiden (Kap. 2.2.8.1) als auch DNA-Chips, die das gesamte Genom von *C. albicans* abdecken, verwendet.

2.2.8.1. Präparation und Belegung des *C. albicans* DNA-Chips mit ausgewählten Oligonukleotiden

Die allgemeine Herstellung des *C. albicans* DNA-Chips erfolgte wie bei Pfoertner *et al.* (2006) beschrieben (durchgeführt von Dr. Robert Geffers, Array Facility, HZI). Es wurden 70mer Oligonukleotide verwendet, die von der Firma Operon bezogen wurden. Dabei handelte es sich um 70 Oligonukleotide von *Candida albicans* (siehe Anhang 6.2) und 50 Oligonukleotide von *Saccharomyces cerevisiae*, die in der Stressantwort der Hefen involviert sind (Abb. 10 grau markierte Felder). Zu den DNA-Chip-Kontrollen zählten (Abb. 10):

- Rasterkontrollen mit jeweils eine für *C. albicans* (Cac01-r) und *S. cerevisiae* (YCONTROL02-R)
- Hybridisierungskontrollen bestehend aus jeweils vier für *C. albicans* (Tab. 7) und *S. cerevisiae* (Tab. 6)
- Negativkontrollen je sieben für *C. albicans* und *S. cerevisiae*
- Positivkontrollen jeweils 12 für *C. albicans* und für *S. cerevisiae*

Bei den Positivkontrollen handelte es sich um Haushaltsgene (engl. *housekeeping genes*), von denen angenommen wird, dass sie nicht reguliert werden und konstitutiv exprimiert vorliegen (siehe Anhang Tab. 13, Tab. 14). Dabei handelt es sich um Gene, die mit dem Grundstoffwechsel der Zelle zusammenhängen. Diese wurden für die spätere Normierung verwendet. Ein Array bestand aus 784 Spots inklusive drei Wiederholungen jedes Oligonukleotids, pro Slide wurden zwei Arrays gespottet.

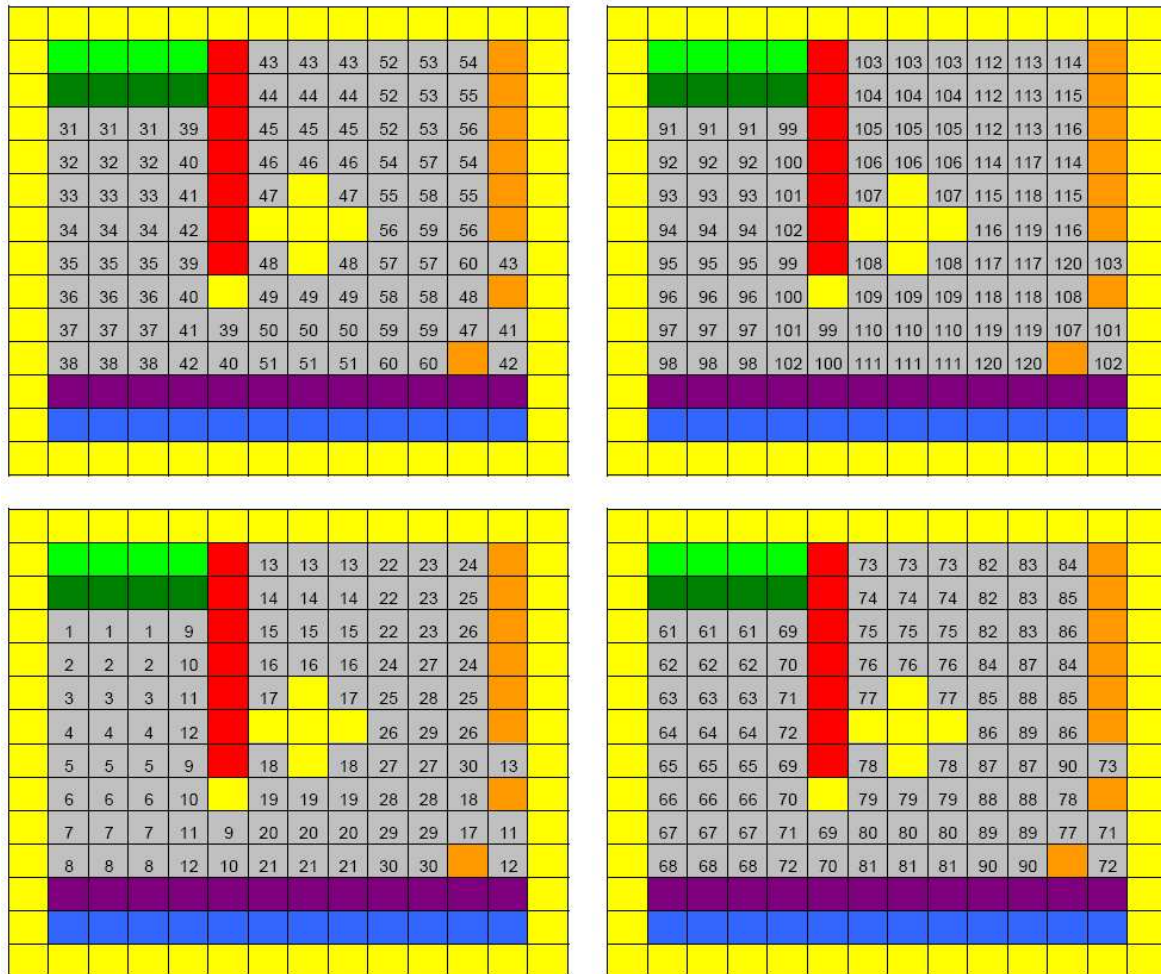


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Arrays. Ein Kästchen repräsentiert einen Spot im Array. Gelb dargestellt sind die Rasterkontrollen (alternierend aufgetragen). Die orange-markierten Spots repräsentieren die Negativkontrollen für *C. albicans* und die rot-markierten die für *S. cerevisiae*. Die Hybridisierungskontrollen für *S. cerevisiae* sind als hellgrün-markierte Spots und die von *C. albicans* als dunkelgrüne Spots gekennzeichnet. Die Positivkontrollen für *C. albicans* sind lila und die für *S. cerevisiae* blau dargestellt. Die grau markierten Felder stellen die zu untersuchenden Oligonukleotide dar, wobei in einem der vier dargestellten Quadrate 30 Oligonukleotide in jeweils drei Wiederholungen vorlagen, mit Ausnahme von je einem Gen, das viermal wiederholt wurde. Dabei entspricht die jeweilige Zahl einem Oligonukleotid. Die dazugehörige Genbezeichnung ist im Anhang 6.2. vermerkt.

2.2.8.2. Genomanalyse von *C. albicans*

Zur Untersuchung des gesamten Transkriptoms von *C. albicans* wurden Chips verwendet, die vom GSC-Genome Sequencing center (Washington University School of Medicine, St. Louis) bezogen wurden und auf denen jedes Gen des Genoms durch 70mer Oligonukleotide repräsentiert wurde.

2.2.8.3. Probenvorbereitung und RNA Isolierung

Die Hefen wurden wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben kultiviert. Für jede Behandlung wurde ein Erlenmeyerkolben angesetzt und nach Zugabe der zu untersuchenden Substanz für eine Stunde inkubiert. Die Kultur wurde in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und bei 6000 rpm (Biofuge Fresco; Heraeus) bei 4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zum Aufschluss bei -80°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets in 600 µL Lysepuffer (RLT Puffer, Qiagen) resuspendiert und in 2 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf), gefüllt mit 0,6 g Glasperlen (0,5 mm Säure-gewaschen, Sigma), transferiert. Die Hefen wurden durch 7 x 30 s Vortexen sowie jeweils 30 s Zwischenkühlen auf Eis aufgeschlossen und anschließend für 2 min bei 4°C und 14000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5402) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit 1 Volumenanteil Ethanol überschichtet. Das RNA-Gemisch wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt. Um die gereinigte RNA aufzukonzentrieren, wurde die Probe über Nacht mit 1 Volumenanteil Isopropanol und 0,5 Volumenanteil 10 M LiCl bei -21°C inkubiert. Nach ca. 18 Stunden wurden die Proben bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge 5402) und 4°C für 30 min zentrifugiert und das RNA-Pellet zweimal mit Ethanol (verdünnt in DEPC-H₂O) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets mit Hilfe einer SpeedVac (Vakuumzentrifuge), wurde es in 12 µL DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde durch photometrische Vermessung der Proben bei 260 nm bestimmt. Zur Ermittlung der Reinheit der RNA wurden die Proben zudem bei 280 nm vermessen. Aus dem Quotienten von 260 nm/280 nm ergab sich der Reinheitsgrad der RNA. Die Integrität der RNA wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) überprüft. Den weiteren experimentellen Teil dieser Untersuchung bis zum Einscannen der DNA-Chips übernahm Claudia Wylegalla (Array Facility, HZI).

2.2.8.4. cDNA Synthese

Die Synthese der cDNA besteht aus zwei Schritten:

1. Erststrangsynthese (reverse Transkription)
2. Zweitstrangsynthese (Herstellung von ds cDNA)

Für die Synthese wurden 5 µg RNA eingesetzt, die in Kap. 2.2.8.3 ermittelt wurde. Die Ansätze waren wie folgt:

Erststrangsynthese

3 µg RNA (bis zu 11 µL)	x µL
T7-dT ₂₃ V Primer (100 pmol/µL; Invitrogen)	1 µL
Hybr. Kontrollen (Operon)	1 µL
DEPC-H ₂ O (Ambion)	bis zu 12 µL

Nach 10 min Inkubation bei 70°C wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert. Anschließend wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

5x Erststrangpuffer	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
10x dNTP-Mix (Invitrogen)	1 µL

Die Proben wurden für 2 min bei 42°C inkubiert, 1 µL Superscript II (200 U/µL, Invitrogen) zugegeben, weitere 60 min bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Zweitstrangsynthese

Der Reaktionsansatz (Komponenten von Invitrogen) für die Synthese des zweiten Stranges war wie folgt zusammengesetzt:

5x Zweitstrangpuffer	30 µL
10 mM dNTP-Mix	3 µL
10 U/µL DNA Ligase	1 µL
10 U/µL DNA Polymerase I	4 µL
2 U/µL RNase H	1 µL

Der Ansatz der Erststrangsynthese wurde hinzugegeben. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurde der Reaktionsansatz für zwei Stunden bei 16°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µL T4 DNA Polymerase wurde der Reaktionsansatz weitere 10 min bei

16°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µL (0,5 M) EDTA zugesetzt und der Reaktionsansatz bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Aufreinigung der ds cDNA

Zu dem Reaktionsansatz der Zweitstrangsynthese wurde zunächst Polyacrylamid (LPA) und 162 µL Phenol/ChCl₃/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzugeben und gemischt. Anschließend wurden beide Phasen in ein Reaktionsgefäß (MaXtract low density, Qiagen) übertragen und 15 min bei 12000xg zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 0,5 Volumenanteil 7,5 M Ammoniumacetat sowie 2,5 Volumenanteil Ethanol (eiskalt) versetzt und gemischt. Das Gemisch wurde sofort 20 min bei Raumtemperatur und 12000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 0,5 mL 80 % Ethanol (eiskalt) gewaschen, getrocknet und in 12 µL RNase freien H₂O resuspendiert. Die cDNA wurde bis zur cRNA Synthese bei -20°C gelagert.

2.2.8.5. cRNA Synthese

In diesem Schritt wurde die cDNA in cRNA transkribiert und die cRNA mit biotinylierten Nukleotiden markiert. Der Ansatz für die cRNA Synthese hatte, mit den von Affimetrix (GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labeling) erworbenen Komponenten, folgende Zusammensetzung:

cDNA	x µL
10x IVT Labeling Puffer	4 µL
IVT Labeling NTP Mix	12 µL
IVT Labeling Enzyme Mix	4 µL
RNase freies H ₂ O	x µL
Endvolumen	40 µL

Nach vorsichtigem Durchmischen des Reaktionsansatzes wurde dieser abzentrifugiert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die cRNA wurde bei -20°C gelagert oder sofort mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) oder dem Cleanup Module (Affimetrix) aufgereinigt. Die Konzentration sowie die Qualität wurden wie in Kap. 2.2.8.3 beschrieben ermittelt.

Für die Hybridisierung wurde die cRNA nach folgendem Ansatz fragmentiert:

cRNA	7,5 µg
DEPC-H ₂ O	x µL
5x Fragmentationspuffer (Affimetrix)	4 µL
Endvolumen	20 µL

Für die genomweite Analyse wurden 15 µg cRNA für den Microarray eingesetzt.

2.2.8.6. Hybridisierung, Waschen, Färben und Scannen

Für die Hybridisierung wurde folgender Ansatz gewählt:

Fragmentierte cRNA	7,5 µg bzw. 15 µg
Hyb-Puffer A (Amersham)	60 µL
Hyb-Puffer B (Amersham)	100 µL
1000x Oligokontrollset (<i>S. cerevisiae</i>)	2 µL
1000x Oligokontrollset (<i>C. albicans</i>)	2 µL
DEPC-H ₂ O	x µL
Endvolumen	200 µL

Tab. 6: Kontrollen für *S. cerevisiae*

Kontrollset [100 µM]	1000x (Endkonz.)	Konzentration auf dem DNA-Chip
YCONTROL02-R	1500 pM	30 pM
YCONTROL04-R	5000 pM	100 pM
YCONTROL97-R	25000 pM	500 pM
YCONTROL98-R	100000 pM	2000 pM
YCONTROL99-R	5000 pM	100 pM

Tab. 7: Kontrollen für *C. albicans*

Kontrollset [100µM]	1000x (Endkonz.)	Konzentration auf dem DNA-Chip
Cac01-r	1500 pM	30 pM
Cac02-r	5000 pM	100 pM
Cac03-r	25000 pM	500 pM
Cac04-r	100000 pM	2000 pM
Cac05-r	5000 pM	100 pM

Der Hybridisierungsansatz wurde 5 min bei 99°C erhitzt, danach 5 min bei 45°C inkubiert und 5 min zentrifugiert. Der komplette Ansatz wurde mit dem jeweiligen DNA-Chip 16 Stunden bei 42°C im Arraybooster hybridisiert. Anschließend wurden die Slides mit dem CodeLink Expression Bioarray System (Amersham Biosciences) nach Anleitung des Herstellers gewaschen, mit Cy5-Streptavidin (Amersham Biosciences) mittels Lucidea Slidepro (Amersham Biosciences) gefärbt und die Daten mit dem arrayWorX^e Scanner (Applied Precicion) ermittelt.

2.2.8.7. Datenanalyse

Die Signalintensitäten der Arrays wurden mit der ImaGene Software 5.5 Standard (BioDiscovery) analysiert und quantifiziert. Dazu wurden auf dem DNA-Chip vorhandene Rasterkontrollen benutzt, um die Lokalisation der einzelnen Signale zu erleichtern. Spots

mit schlechter Qualität, die mit eins bis drei gekennzeichnet wurden, wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Für die genomweiten Chips wurden die mit eins und zwei gekennzeichneten Spots nicht berücksichtigt. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm Array Assist 5.5.1 (Powered by avadis™, Stratagene) verwendet. Zur Überprüfung der Hybridisierungseffizienz der einzelnen DNA-Chips wurden zusätzliche Oligonukleotide hinzugezogen, deren markierter Gegenstrang im cRNA Cocktail enthalten war und in verschiedenen Konzentrationen vorlag. Des Weiteren wurden Haushaltsgene als Positivkontrollen in die Untersuchung einbezogen. Dabei handelte es sich um Gene, von denen angenommen wurde, dass ihre Expression nicht durch die Behandlung der Organismen reguliert wird und die konstitutiv exprimiert werden. Die Normierung erfolgte über die Haushaltsgene, deren Medianwert errechnet und dieser auf einen Faktor von 150 skaliert wurde. Anschließend wurden die Werte logarithmiert und die Replikate einer Untersuchungsserie zusammengefasst. Als Basis einer Untersuchung wurde die Behandlung der Hefen mit Methanol (Lösungsmittelkontrolle) gewählt, um die direkten Einflüsse der Substanzen zu ermitteln. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA-Analyse berechnet und $p < 0,05$ als signifikant erachtet. Bei den Ganz-Genom-Chips konnten nur ungewöhnlich geringe Signalintensitäten detektiert werden. Daher wurde bei der Auswertung zusätzlich ein Fold Change (FC) von zwei berücksichtigt, d.h. die durch Behandlungen erzeugten Signale waren mindestens zweimal so hoch wie im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Zur Erstellung der hierarchischen Cluster wurde das Programm Genesis 1.6.0 Beta 1 (Graz University of Technology, Österreich) verwendet.

Die *S. cerevisiae*-Gene, die neben den *C. albicans*-Genen auf dem Chip vorhanden waren, wurden bei allen Auswertungen nicht berücksichtigt, da es sich um reine *C. albicans*-Kulturen handelte.

2.2.9. Phagozytose-Assay

Die Untersuchung der Phagozytose von *C. albicans* durch Immunzellen wurde mit Hilfe eines fluorimetrischen Phagozytose-Assay durchgeführt (Klippel & Bilitewski, 2007). Dafür wurden die Hefen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert. Hierzu wurde von den Hefen eine Übernachtskultur angesetzt (Kap. 2.2.3.1) und die Zellzahl bestimmt (Kap. 2.2.2). Von der Suspension wurden 1×10^8 Hefezellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und bei $16000 \times g$ für 5 min bei 24°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL PBS (Invitrogen) resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Dann wurde zu den Hefen 1 mL FITC-Färbelösung (1,25 mM FITC gelöst in 0,1 M NaHCO_3 , pH 9) gegeben und über Nacht schüttelnd bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Hefen dreimal mit 1 mL PBS gewaschen. Sofern die Hefen nicht sofort eingesetzt wurden, wurden sie bei -20°C gelagert. Vor Einsatz der Hefen im Phagozytostest wurden 500 μL von 1×10^8 Zellen/mL mit 500 μL hitzeinaktiviertem FBS (engl. *fetale bovine serum*; für 30 min bei 55°C behandelt; Lonza) gemischt und für 20 min bei 37°C schüttelnd inkubiert.

RAW264.7-Makrophagen wurden in 175 cm^2 -Zellkulturflaschen bei 37°C und 10 % CO_2 in 50 mL DMEM kultiviert. Der Ansatz wurde durch eine Verdünnung von 1:10 aus einer konfluent gewachsenen Kultur angesetzt. Nachdem die Zellen erneut eine Konfluenz erreicht hatten (nach etwa 4 Tagen), wurde vor der Ernte das Zellkulturmedium abgezogen und ein Drittel des vorherigen Kulturvolumens zugeführt, um die Zellen aufzukonzentrieren. Anschließend wurden die adhären wachsenden Zellen vom Boden abgekratzt und gezählt (Kap. 2.2.2). Eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/mL wurde eingestellt und 100 μL dieser Zellsuspension pro Well in eine 96Well-Platte gegeben. Dabei wurden einige Wells für Hefekontrollen freigelassen. Anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden bei 37°C und 10 % CO_2 kultiviert, damit sich die Zellen am Boden absetzen konnten.

Für die Infektion wurde nun eine Hefensuspension von 4×10^6 Hefen/mL in DMEM angesetzt. Dann wurde das Kulturmedium der RAW264.7-Makrophagen durch Ausschlagen der Platten entfernt und jeweils 100 μL pro Well der Hefensuspension hinzugegeben. Hierbei wurden auch die zuvor leer gebliebenen Wells befüllt und dienten als Kontrolle. Für jeden Hefestamm wurde eine Reihe befüllt. Anschließend wurden die 96Well-Platten für 30 min bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Die Zugabe der Testsubstanz variierte und wird im Kap. 3.5 beschrieben. Nach der Inkubation wurde zunächst die Fluoreszenz der

Hefen bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm mittels Multi-Well-Fluorimeter von unten gemessen. Dann wurde der Überstand durch Ausschlagen der 96Well-Platte entfernt und pro Well wurden 100 µL einer Trypanblau-Lösung (250 µg/mL gelöst in PBS) hinzugegeben. Nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand entfernt und die Fluoreszenz der Hefen wie oben beschrieben bestimmt. Da Trypanblau die intakte Zellmembran vitaler Makrophagen nicht passieren kann, wurden so nur phagozytierte Hefen fluorimetrisch detektiert.

Bei der Auswertung wurde zunächst von den jeweiligen Replikaten der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt (Relative Fluoreszenzeinheit RFU). Da die FITC-Färbung verschiedener Hefestämme unterschiedlich effizient war, wurden die Mittelwerte der Messung vor der Trypanblau-Zugabe auf den höchsten Messwert normiert (relativer Faktor). Der Mittelwert der Hefen ohne Inkubation mit den Makrophagen (Kontrolle) wurde als Blindwert von den Mittelwerten nach Zugabe von Trypanblau abgezogen und mit dem oben erwähnten relativen Faktor multipliziert.

2.2.10. Statistische Auswertung und verwendete Programme

Für die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichung sowie für den statistischen Vergleich von Experimenten mittels Student's t-Test wurde das Programm Excel 2003 (Microsoft Corp.) verwendet. Die Graphen wurden sowohl mit Excel 2003 als auch OriginPro 8G (OriginLab Corp.) erstellt. Abbildungen wurden mit der Software Adobe Photoshop Version 10.0 (Adobe Systems Inc.) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Wachstumsanalysen von *C. albicans* nach Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil

3.1.1. Wachstumshemmung im Agar-Diffusionstest

In der Literatur waren unterschiedliche, teils widersprüchliche Aussagen zur Wirksamkeit der Substanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil zu finden. Daher wurde zunächst das Wachstumsverhalten verschiedener *C. albicans*-Stämme nach der Behandlung mit den Substanzen überprüft. Dies erfolgte mit dem sogenannten Agar-Diffusionstest (Kap. 2.2.3.3). Hierfür wurden die in Agar eingebetteten Hefen mit einem Substanz-tragenden Plättchen, welches auf die Agaroberfläche gelegt wurde, inkubiert. Die Substanz diffundierte in den Agar und es bildete sich ein Konzentrationsgradient der Substanz um das Plättchen aus. Es entstand bei einer Wachstumshemmung ein sog. Hemmhof (Abb. 11; exemplarisch dargestellt $\Delta sit4$ -Mutante mit Ambruticin VS-3 als Testsubstanz), dessen Durchmesser in Abhängigkeit von der Substanz und vom Hefestamm variierte.

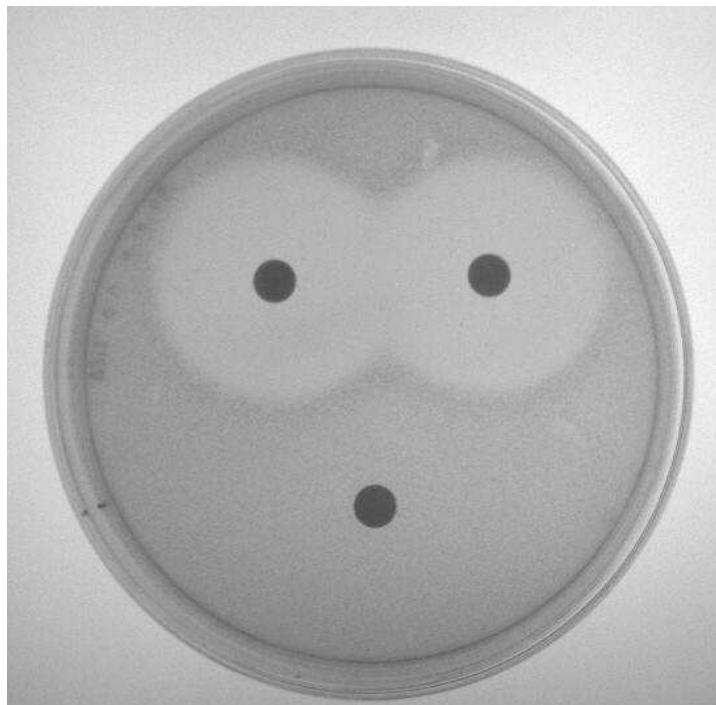


Abb. 11: Plättchentest mit Ambruticin VS-3 [1 mg/mL] (oben) und Methanol (unten) als Lösungsmittelkontrolle durchgeführt mit *C. albicans* $\Delta sit4$.

Tab. 8: Einfluss von Substanzen auf das Wachstum verschiedener *C. albicans*-Stämme und filamentöser Pilze. Gezeigt sind die Durchmesser der Hemmhöfe der getesteten Substanzen (ink = inkomplett; n. t. = nicht getestet)

<i>C. albicans</i> Stamm	Ambruticin VS-3 [1 mg/mL]	Jerangolid A [1 mg/mL]	Fludioxonil [1 mg/mL]	Methanol (Kontrolle)
1386	24 mm (ink)	-	-	-
CAF2-1	-	-	-	-
$\Delta hog1$	-	-	-	-
$\Delta pbs2$	-	-	-	-
$\Delta ssk1$	-	-	-	-
$\Delta sln1$	20 mm (ink)	15 mm (ink)	10 mm (ink)	-
$\Delta chk1$	-	-	-	-
$\Delta cos1$	-	-	-	-
$\Delta sit4$	27 mm	20 mm	14 mm (ink)	-
$\Delta gpp1$	-	-	n. t.	-
Filamentöse Pilze	Ambruticin VS-3 [1 mg/mL]	Jerangolid A [1 mg/mL]	Fludioxonil [1-20 mg/mL]	Methanol (Kontrolle)
<i>Ustilago zeae</i>	41 mm	41 mm	n. t.	-
<i>Trichoderma koningii</i>	59 mm	50 mm	n. t.	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	42 mm	36 mm	n. t.	-
<i>Pythium debaryanum</i>	40 mm	41 mm	n. t.	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	34 mm	30 mm	31 mm	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	33 mm	25 mm	30 mm	-
<i>Aspergillus niger</i>	47 mm	n. t.	n. t.	-

Der Effekt auf das Wachstum aller getesteten Stämme ist in Tab. 8 dargestellt. Bei dem Wildstamm 1386 wurde von den getesteten Substanzen nur bei der Behandlung mit Ambruticin VS-3 ein Hemmhof gebildet, die Wachstumshemmung war jedoch zeitlich begrenzt, so dass das Hefenwachstum wieder eingesetzte, was sich durch einen getrübbten Hemmhof äußerte (Tab. 8). Hingegen wurde bei CAF2-1, dem Referenzstamm der Deletionsmutanten, keine Wachstumshemmung beobachtet.

Des Weiteren wurde das Wachstum von Deletionsmutanten untersucht, denen je ein Gen, kodierend für ein Protein aus dem HOG-Signalweg, fehlte. Mit Hilfe dieser Deletionsmutanten sollte überprüft werden, ob durch das Fehlen von Komponenten aus dem HOG-Signalweg das Wachstum von *C. albicans* in Gegenwart der Testsubstanzen beeinflusst wird (Tab. 8). Von den Mutanten zeigten nur die $\Delta sln1$ -Mutante und die $\Delta sit4$ -Mutante bei allen drei Testsubstanzen die Ausbildung eines Hemmhofes. Ambruticin VS-3 führte zu Hemmhofdurchmessern von 20 bzw. 27 mm (Tab. 8), während die durch Jerangolid A (15 bzw. 20 mm) und Fludioxonil (10 bzw. 14 mm) verursachten Hemmhöfe kleiner

waren. Allerdings war die Wirkung bei der $\Delta sln1$ -Mutante wie beim Stamm 1386 zeitlich begrenzt. Das wurde auch bei der $\Delta sit4$ -Mutante bei der Fludioxonil-Behandlung beobachtet.

Zum Vergleich wurden zusätzlich filamentöse Pilze (Tab. 8) im Agar-Diffusionstest eingesetzt, die alle auf die getesteten Substanzen mit Hemmhöfen von 25 mm bis 59 mm reagierten. Somit wiesen sie eine weitaus höhere Sensitivität gegen die Substanzen auf als *C. albicans*.

3.1.2. MIC-Bestimmung von Ambruticin VS-3

Für das weitere Arbeiten mit den Substanzen musste eine Konzentration ermittelt werden, bei der *C. albicans* wächst, aber dennoch von der Substanz beeinflusst wird. Dafür wurde eine MIC-Bestimmung (engl. *minimal inhibitory concentration*) durchgeführt. Für die Untersuchung wurde *C. albicans* 1386 verwendet, die bereits im Agar-Diffusionstest auf Ambruticin VS-3 sensitiv reagierte (Kap. 3.1.1). Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von Ambruticin VS-3 in einer 96Well-Mikrotiterplatte angesetzt und eine konstante Zellzahl hinzugegeben. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.2.3.2 beschrieben. Innerhalb von fünf Stunden wurde stündlich die OD_{620nm} gemessen.

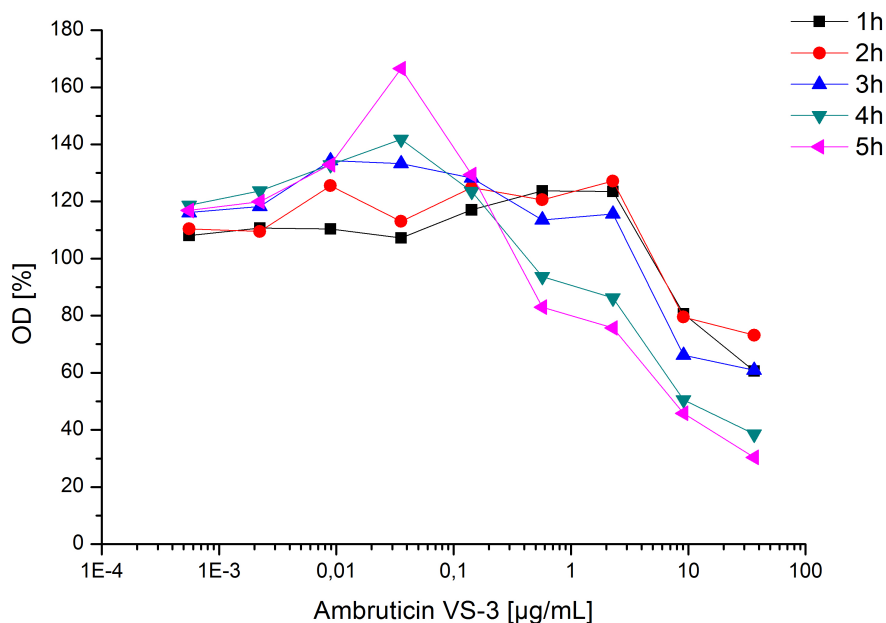


Abb. 12: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) von Ambruticin VS-3 bei *C. albicans* 1386. Dargestellt ist das Wachstum zu verschiedenen Zeitpunkten in Abhängigkeit der Ambruticin VS-3-Konzentration. Der mit Ambruticin VS-3-behandelte Ansatz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle (Methanol) bezogen (100%).

Nach zwei Stunden war das Wachstum bei 10 µg/mL um 20 % und nach fünf Stunden um etwa 50 % reduziert (Abb. 12). Bei einer Konzentration von 1 µg/mL war nach fünf Stunden ein ca. 25 % geringeres Wachstum zu beobachten. Da die Behandlung mit Ambruticin VS-3 bei einer Konzentration von 1 µg/mL nach fünf Stunden zu einer partiellen Wachstumsreduktion von *C. albicans* 1386 führte, wurde diese Konzentration für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.1.3. Wachstum von *C. albicans* auf festen und in flüssigen Medium nach Substanzbehandlung

In der vorangegangenen Untersuchung wurde für Ambruticin VS-3 eine geeignete Konzentration von 1 µg/mL ermittelt. Als Konzentration für Jerangolid A wurde ebenfalls 1 µg/mL gewählt. In der Literatur wurde einen Wachstumseinfluss auf *C. albicans* durch Fludioxonil bei einer Konzentration von 1,6-25 µg/mL beschrieben (Ochiai *et al.*, 2002). Daher wurde für die weiteren Untersuchungen eine Fludioxonil-Konzentration von 20 µg/mL gewählt.

Im folgenden Schritt wurde das Wachstumsverhalten der *C. albicans*-Stämme 1386 und CAF2-1 sowie der Deletionsmutanten unter Einfluss von Ambruticin VS-3 (1 µg/mL), Jerangolid A (1 µg/mL) und Fludioxonil (20 µg/mL) näher untersucht. Die Hefen wurden dafür bei zwei verschiedenen Bedingungen kultiviert: auf Fest- (Kap. 2.2.3.4) und in Flüssigmedium (Kap. 2.2.3.1). Bei der Kultivierung der Hefen auf Festmedium wurde der Einfluss auf die Zellzahl betrachtet und im Flüssigmedium wurde der Einfluss auf den zeitlichen Wachstumsverlauf studiert.

Der Wachstumstest auf Festmedium zeigte eine deutliche Wachstumshemmung bei dem Stamm 1386 durch Ambruticin VS-3 und Fludioxonil, nur bei der höchsten Zellzahl war noch ein Wachstum sichtbar (Abb. 13). CAF2-1 hingegen zeigte keine Beeinträchtigung des Wachstums nach der Substanzbehandlung. Auch die Deletionsmutanten reagierten nicht auf die Substanzen, mit Ausnahme der $\Delta sit4$ -Mutante, bei der eine Wachstumshemmung der Hefen in Gegenwart der Substanzen auftrat (Abb. 13).

Die Kultivierung in Flüssigmedium zeigte beim Stamm CAF2-1 sowie den Mutanten $\Delta cos1$, $\Delta hog1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta sk1$ einen ähnlichen Wachstumsverlauf. Das Wachstum dieser Hefen wurde durch die Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A nicht beeinträchtigt (in Abb. 14A exemplarisch dargestellt Stamm CAF2-1). Nach der Zugabe von Fludioxonil zeigte sich nach zwei Stunden ein wenig reduziertes Wachstum und nach fünf Stunden war die Vermehrungsrate um knapp 20 % reduziert.

Die Mutanten $\Delta sit4$ und $\Delta chk1$ wiesen bei der Zugabe von Ambruticin VS-3 nach fünf Stunden eine Wachstumsreduktion von ca. 10 % auf und bei der Fludioxonil-Behandlung wurde eine Wachstumshemmung von ca. 20 % beobachtet. Bei den mit Jerangolid A behandelten Hefen traten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf (nicht dargestellt).

Im Gegensatz dazu zeigten die $\Delta sln1$ -Mutante und der Stamm 1386 eine deutliche Wachstumsminde- rung bei allen drei Substanzbehandlungen (Δsln -Mutante exemplarisch dargestellt in Abb. 14B). Nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 wurde das Wachstum bei beiden Stämmen nach fünf Stunden um 30 % reduziert, mit Jerangolid A um etwa 20 % und mit Fludioxonil um ca. 35 %. Die $\Delta gpp1$ -Mutante wurde nur mit Fludioxonil behandelt und wies einen ähnlichen Wachstumsverlauf wie die $\Delta sln1$ -Mutante und der Stamm 1386 auf.

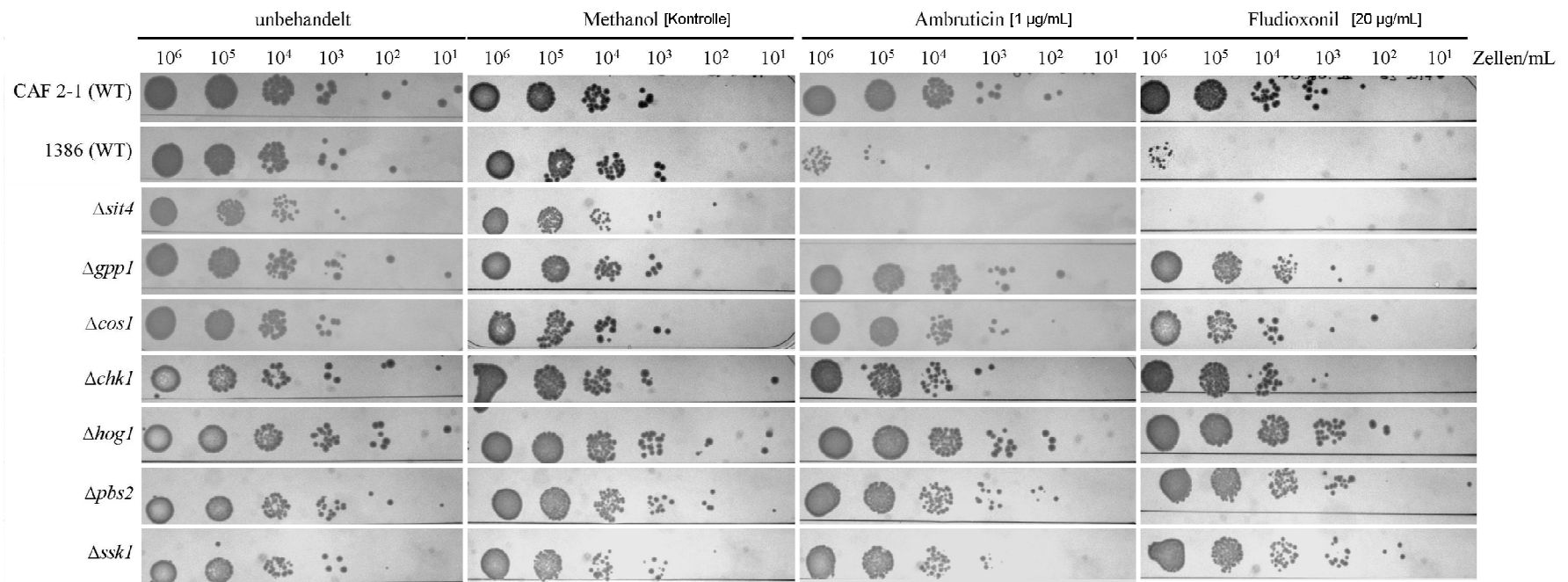


Abb. 13: Wachstumstest mit *C. albicans* auf Agar. Der Testansatz und die Kultivierung von den *C. albicans*-Stämmen wurde durchgeführt wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben.

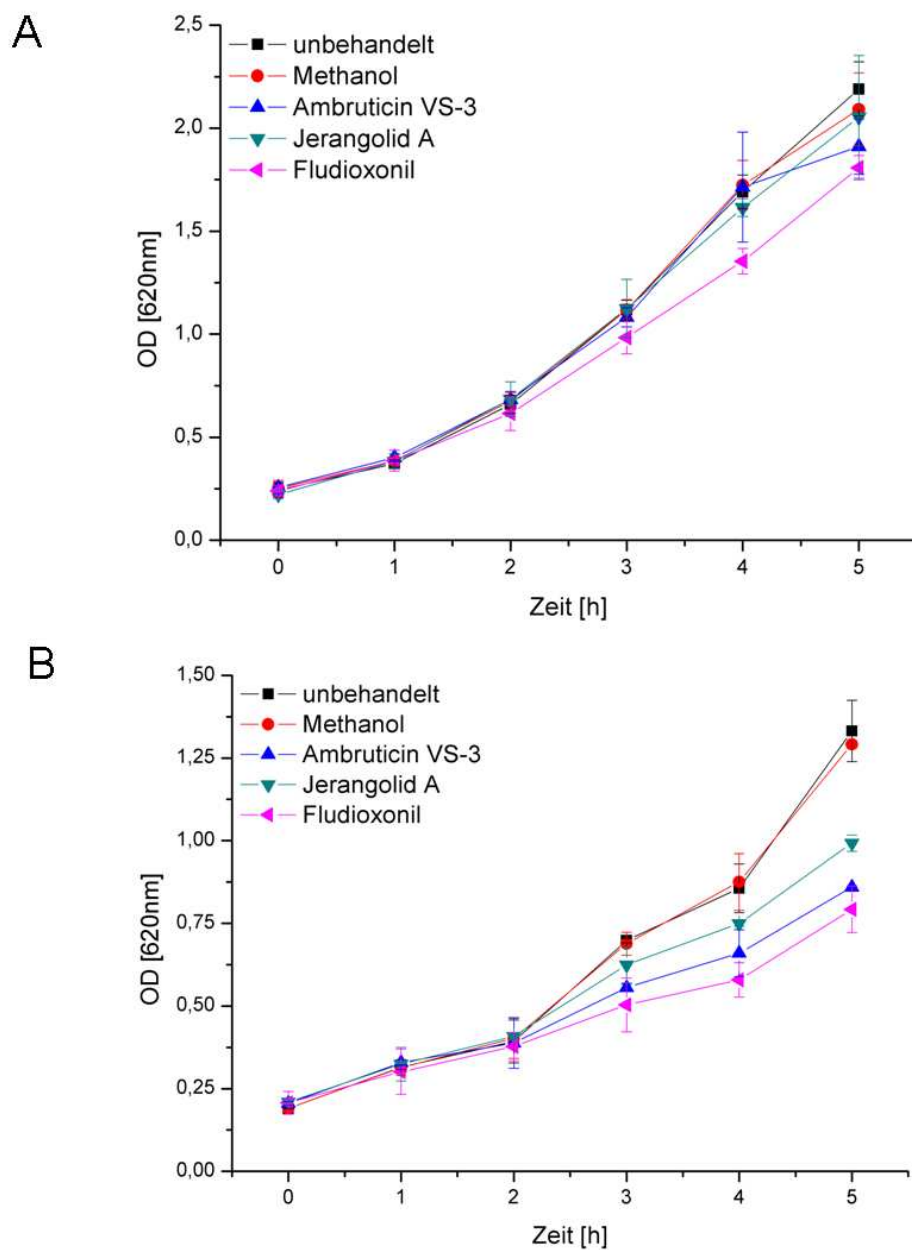


Abb. 14: Wachstum von *C. albicans* CAF2-1 (A) und der $\Delta sln1$ -Mutante (B) unter Einfluss von Methanol (Kontrolle), Ambruticin VS-3 [1 $\mu\text{g/mL}$], Jerangolid A [1 $\mu\text{g/mL}$] und Fludioxonil [20 $\mu\text{g/mL}$]. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Ansätze.

3.2. Untersuchungen der Wirkung der Substanzen auf metabolische Prozesse in *C. albicans*

In Hefen wird unter osmotischen Stressbedingungen der HOG-Signalweg aktiviert. Das führt zu einer gesteigerten Glycerinbiosynthese, so dass der Glyceringehalt in der Hefezelle zunimmt. Es wurde bereits berichtet, dass Fludioxonil in *C. albicans* und Ambruticin VS-3 in *H. anomala* zu einer Glycerinakkumulation führen (Ochiai *et al.*, 2002; Knauth & Reichenbach, 2000). Daraus wurde abgeleitet, dass diese beiden Substanzen Signalwege der osmotischen Stressantwort beeinflussen. Glycerin ist aber auch ein Nebenprodukt der alkoholischen Gärung. Dieser Prozess wird in Abwesenheit von Sauerstoff anstelle der Atmung zur Energiegewinnung genutzt. Dabei werden Kohlenhydrate zu Ethanol abgebaut.

Daher kann eine erhöhte Glycerinkonzentration aber nicht nur Indikator für die Aktivierung osmotischer Stressabwehrreaktionen sein, sondern ist auch Nebenprodukt der alkoholischen Gärung (Abb. 9). Somit ist eine erhöhte Glycerinkonzentration als einziger Parameter nicht ausreichend, um eindeutige Aussagen darüber zu treffen, ob die Substanzen den HOG-Signalweg aktivieren.

Um dies zu überprüfen, wurde in den folgenden Untersuchungen neben dem Glyceringehalt auch der Ethanol- und Sauerstoffgehalt im Medium bestimmt. Zur Validierung wurden zusätzlich Substanzen eingesetzt, von denen bekannt ist, dass sie osmotischen Stress erzeugen oder die Atmungskette hemmen, so dass die alkoholische Gärung angeschaltet wird. Hierbei handelte es sich um Sorbitol, zur Induktion der osmotischen Stressantwort, Myxothiazol, als Inhibitor der Atmungskette (Bourges *et al.*, 2005), und Pyrrolnitrin, das in hohen Konzentrationen die Atmungskette blockiert und in geringeren Konzentrationen die osmotische Stressantwort induziert (Okada *et al.*, 2005). Ergänzend zu den Untersuchungen wurden Deletionsmutanten eingesetzt, um zu überprüfen, ob Gene aus dem osmotischen Stressweg essentiell für die Wirkung der Testsubstanzen sind (siehe Abb. 7 zur Stellung der deletierten Gene im HOG-Signalweg).

3.2.1. Glycerinbestimmung bei *C. albicans* nach Substanzbehandlung

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Testsubstanzen den Glyceringehalt von *C. albicans* verändern. Mit Hilfe eines Glycerin-Enzym-Tests wurde der Überstand der Hefen stündlich analysiert (Kap. 2.2.5). In Abb. 15 und Abb. 16 werden die Daten von drei und fünf Stunden Kultivierungsdauer exemplarisch gezeigt.

Beim Wildstamm 1386 war der Glyceringehalt im Medium bereits drei Stunden nach Zugabe von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil signifikant erhöht und stieg mit der Zeit weiterhin an (Abb. 15). Bei Sorbitol und bei Myxothiazol zeigte der Stamm 1386 ebenfalls einen signifikanten Glycerinanstieg nach drei und fünf Stunden (Abb. 15). Eine signifikante Glycerinzunahme wurde bei Pyrrolnitrin (5 µg/mL, 10 µg/mL) zu beiden Zeitpunkten gemessen. Bei einer Pyrrolnitrin-Konzentration von 20 µg/mL war erst nach fünf Stunden ein signifikanter Anstieg von Glycerin zu beobachten (Abb. 15).

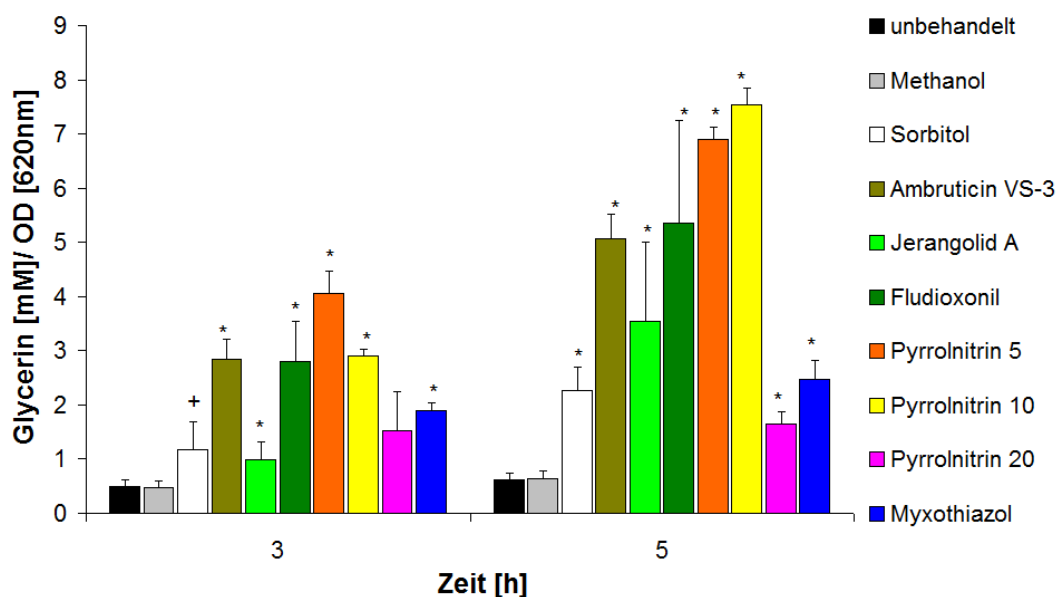


Abb. 15: Bestimmung von extrazellulärem Glycerin bei *C. albicans* 1386. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die Hefen fünf Stunden ohne Substanzen, mit Ambruticin VS-3 [1 µg/mL], Jerangolid A [1 µg/mL], Fludioxonil [20 µg/mL], Methanol (Lösungsmittelkontrolle) sowie in einem Experiment mit Sorbitol [1 M], Pyrrolnitrin (5, 10, 20 µg/mL) und Myxothiazol [1 µg/mL] kultiviert (Kap. 2.2.3.1). Im Überstand wurde Glycerin in je vier Parallelansätzen gemessen (Kap. 2.2.5) und die Daten analysiert (Kap. 2.2.10). Dargestellt ist der extrazelluläre Glyceringehalt bezogen auf die OD_{620nm}. Die Signifikanz wurde aus dem Vergleich von Behandlung zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt (Student's T-Test: *p<0,001; +p<0,01).

Der Stamm CAF2-1, der mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil behandelt wurde, zeigte sowohl nach drei als auch nach fünf Stunden einen signifikanten Glycerinanstieg bei Ambruticin VS-3 (Abb. 16). Bei Jerangolid A und Fludioxonil war erst nach fünf Stunden ein signifikanter Glycerinanstieg zu beobachten.

Die Histidinkinase-Mutanten $\Delta sln1$, $\Delta chk1$ und $\Delta cos1$ zeigten unterschiedliche Reaktionen auf die Substanzbehandlungen. Bei der $\Delta sln1$ -Mutante wurde nach drei und fünf Stunden ein signifikanter Anstieg an Glycerin bei allen Substanzen beobachtet (Abb. 16). Dabei ähnelte das Profil dem des Stammes 1386 (Vergleich Abb. 15). Ähnlich wie CAF2-1 reagierte die $\Delta chk1$ -Mutante nach drei und fünf Stunden mit einem signifikanten Glycerinanstieg bei Ambruticin VS-3 (Abb. 16). Nach fünf Stunden wurde auch bei Jerangolid A und Fludioxonil eine Glycerinzunahme beobachtet. Generell war der Glyceringehalt der $\Delta chk1$ -Mutante höher als bei CAF2-1. Die $\Delta cos1$ -Mutante zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Zunahme von Glycerin (Abb. 16).

Bei der $\Delta sit4$ -Mutante wurde nach drei Stunden bei Ambruticin VS-3 und bei Fludioxonil eine signifikante Glycerinzunahme beobachtet. Nach fünf Stunden war der Glyceringehalt bei allen drei Behandlungen erhöht (Abb. 16).

Die $\Delta hog1$ -Mutante zeigte nach fünf Stunden bei der Behandlung mit Fludioxonil eine signifikante Glycerinabnahme (Abb. 16). Die Behandlung von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A zeigte keine Wirkung auf die Glycerinproduktion. Bei den Deletionsmutanten $\Delta ssk1$ und $\Delta pbs2$ war der Glyceringehalt bei allen Substanzbehandlungen unverändert. Eine Auffälligkeit bei diesen Mutanten im Vergleich zum Referenzstamm CAF2-1 war der grundsätzlich geringe Glyceringehalt.

Die $\Delta gpp1$ -Mutante wurde mit Fludioxonil behandelt und es konnte kein Glycerin nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

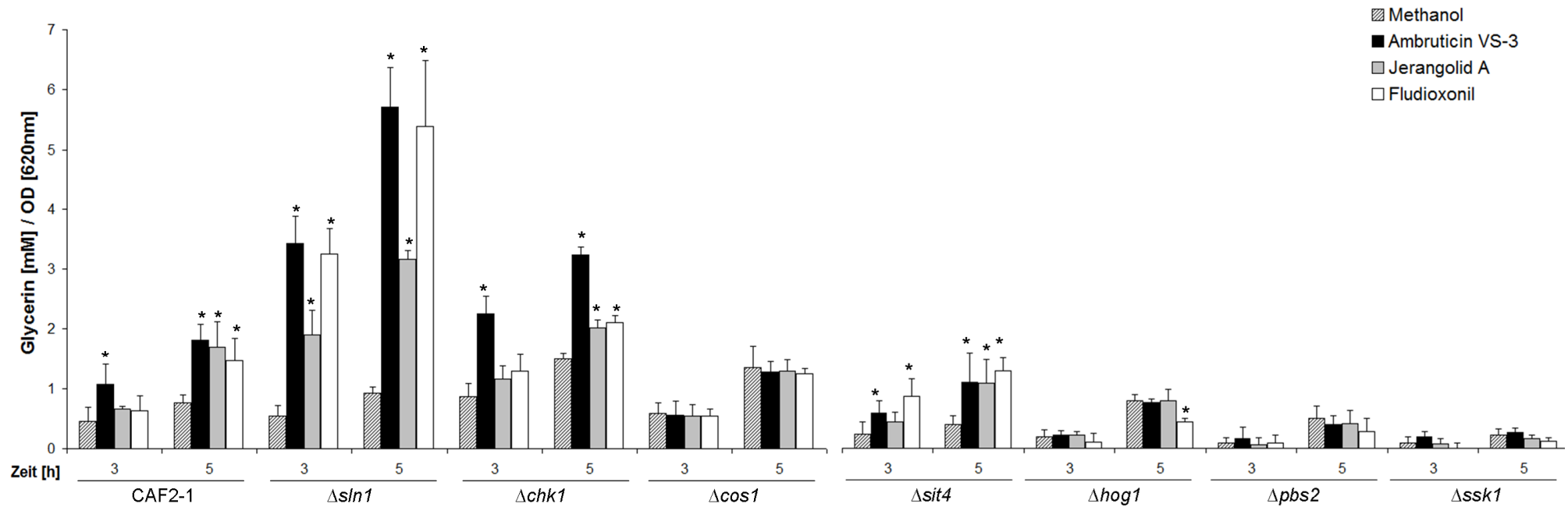


Abb. 16: Extrazelluläre Glycerinbestimmung nach Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil sowie Methanol (Kontrolle) bei *C. albicans* CAF 2-1 (Referenzstamm) und den Deletionsmutanten $\Delta sln1$, $\Delta chk1$, $\Delta cos1$, $\Delta sit4$, $\Delta hog1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta ssk1$. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die Hefen fünf Stunden mit Ambruticin VS-3 [1 $\mu\text{g/mL}$], Jerangolid A [1 $\mu\text{g/mL}$], Fludioxonil [20 $\mu\text{g/mL}$] sowie Methanol (Lösungsmittelkontrolle) kultiviert (Kap. 2.2.3.1). Im Kulturüberstand wurde Glycerin in je vier Parallelansätzen gemessen (Kap. 2.2.5) und die Daten analysiert (Kap. 2.2.10). Gezeigt ist der extrazelluläre Glyceringehalt bezogen auf die $OD_{620\text{nm}}$. Die Signifikanz wurde aus dem Vergleich von Behandlung zur Lösungsmittelkontrolle (Methanol) ermittelt (Student's T-Test: * $p < 0,001$).

3.2.2. Ethanolbestimmung bei *C. albicans* nach Substanzbehandlung

Da in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt werden konnte, dass die Kultivierung in Gegenwart der Testsubstanzen bei einigen Stämmen zu einem Anstieg der extrazellulären Glycerinkonzentration führte (siehe Kap. 3.2.1), sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Glycerinzunahme durch osmotischen Stress oder durch alkoholische Gärung verursacht wurde. Dafür wurde ein Ethanol-Enzym-Test angewandt (Kap. 2.2.6), um den Ethanolgehalt im Überstand zu bestimmen.

Beim Stamm 1386 wurde nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil eine Glycerinzunahme beobachtet (Abb. 15), allerdings blieb der Ethanolgehalt bei den Behandlungen nach drei und fünf Stunden unverändert (Abb. 17). Nach der Behandlung mit Sorbitol und Pyrrolnitrin (5 µg/mL) wurde ebenfalls keine Veränderung beim Ethanolgehalt beobachtet. Hingegen führte die Behandlung mit 10 µg/mL Pyrrolnitrin zu signifikanten Erhöhungen der Ethanolkonzentrationen sowohl nach drei als

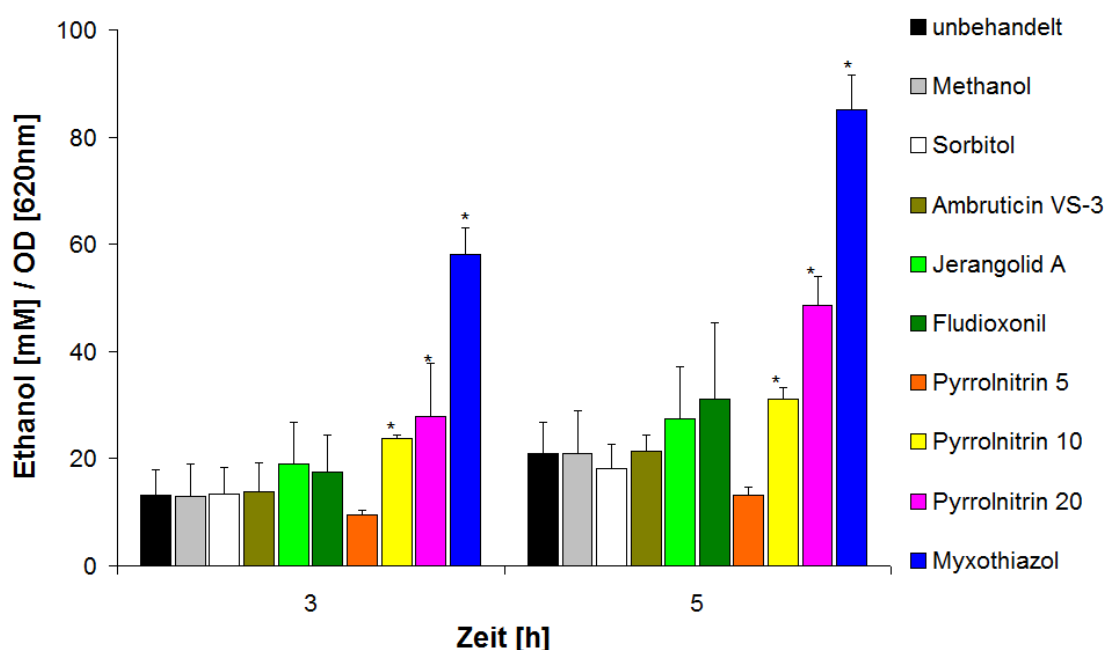


Abb. 17: Bestimmung von Ethanol bei *C. albicans* 1386 unbehandelt und nach Behandlung mit Sorbitol [1 M], Ambruticin VS-3 [1 µg/mL], Jerangolid A [1 µg/mL], Fludioxonil [20 µg/mL], Pyrrolnitrin [5, 10, 20 µg/mL], Myxothiazol [1 µg/mL] sowie Methanol (Lösungsmittelkontrolle). In zwei unabhängigen Experimenten wurden die Hefen für fünf Stunden mit den Testsubstanzen kultiviert (Kap. 2.2.3.1). Im Überstand wurde Ethanol in je vier Parallelansätzen gemessen (Kap. 2.2.6) und die Daten analysiert (Kap. 2.2.10). Dargestellt ist der Ethanolgehalt bezogen auf die OD₆₂₀. Die Signifikanz wurde aus dem Vergleich der Behandlung zur Lösungsmittelkontrolle (Methanol) ermittelt (Student's T-Test: *p < 0,001)

auch nach fünf Stunden (Abb. 17). Bei einer Pyrrolnitrin-Konzentration von 20 µg/mL und Myxothiazol (1 µg/mL) wurden die Ethanolkonzentrationen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Methanol) zu beiden Zeitpunkten mehr als verdoppelt.

Der Stamm CAF2-1 zeigte nach Zugabe von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A keine Veränderung des Ethanolgehaltes (Abb. 18). Hingegen bewirkte Fludioxonil bei CAF2-1 zu allen untersuchten Zeitpunkten einen Anstieg der Ethanolkonzentration um einen Faktor von ca. 1,7 im Vergleich zu Methanol.

Die Deletionsmutanten $\Delta cos1$, $\Delta sit4$, $\Delta pbs2$ sowie $\Delta ssk1$ wiesen keine Veränderungen des Ethanolgehaltes auf, allerdings traten deutliche Schwankungen innerhalb der Messwerte auf (Abb. 18). Bei der $\Delta gpp1$ -Mutante konnte nach der Fludioxonil-Behandlung kein Ethanol gemessen werden (nicht dargestellt).

Bei einigen Deletionsmutanten konnten Veränderungen des Ethanolgehalts gezeigt werden. So führte bei der $\Delta sn1$ -Mutante die Zugabe von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A zu einer Abnahme von Ethanol nach fünf Stunden um etwa 30 % im Vergleich zur Kontrolle (Methanol). Ähnlich wie CAF2-1 zeigte die $\Delta chk1$ -Mutante bei Fludioxonil einen Anstieg der Ethanolkonzentration nach drei und fünf Stunden. Außerdem wurde bei Jerangolid A nach drei Stunden bei der $\Delta chk1$ -Mutante ein signifikanter Ethanolanstieg beobachtet. Bei der $\Delta hog1$ -Mutante trat nach fünf Stunden unter Fludioxonil-Behandlung ein 1,5facher Ethanolanstieg auf.

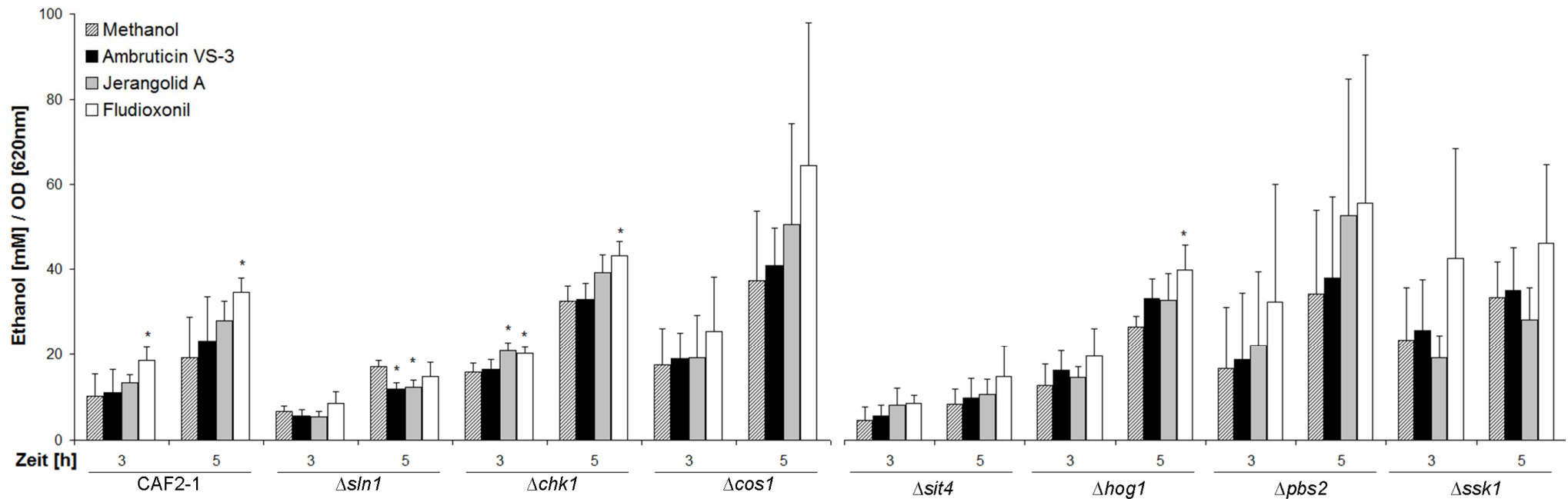


Abb. 18: Ethanolbestimmung nach Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil sowie Methanol (Kontrolle) beim Referenzstamm *C. albicans* CAF2-1 und den Deletionsmutanten $\Delta sln1$, $\Delta chk1$, $\Delta cos1$, $\Delta sit4$, $\Delta hog1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta ssk1$. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die Hefen fünf Stunden mit Ambruticin VS-3 [1 $\mu\text{g/mL}$], Jerangolid A [1 $\mu\text{g/mL}$], Fludioxonil [20 $\mu\text{g/mL}$] sowie Methanol (Lösungsmittelkontrolle) kultiviert (Kap. 2.2.3.1). Im Kulturüberstand wurde Ethanol in je vier Parallelansätzen gemessen (Kap. 2.2.5) und die Daten analysiert (Kap. 2.2.10). Dargestellt ist der Ethanolgehalt bezogen auf die $\text{OD}_{620\text{nm}}$. Die Signifikanz wurde aus dem Vergleich von Behandlung zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt (Student's T-Test: * $p < 0,001$).

3.2.3. Sauerstoffverbrauch nach Behandlung von *C. albicans* mit Ambruticin VS-3, Pyrrolnitrin und Myxothiazol

In der Literatur wurde über eine Kreuzresistenz von Ambruticin VS-3 und Pyrrolnitrin berichtet (Gerth *et al.*, 1996). Zudem wurde für beide Substanzen ein Einfluss auf den osmotischen Stresssignalweg beschrieben (Knauth & Reichenbach, 2000; Vetcher *et al.*, 2007). Allerdings gibt es auch Hinweise, dass Pyrrolnitrin eine Wirkung auf die Atmungskette von *S. cerevisiae* hat (Tripathi & Gottlieb, 1969). Daher sollte ergänzend zu den vorherigen Untersuchungen (Kap. 3.2.2) überprüft werden, ob Ambruticin VS-3 und Pyrrolnitrin die Atmungskette in *C. albicans* beeinflussen. Myxothiazol, ein bekannter Atmungskettenhemmer, diente in der Versuchsreihe als Kontrollsubstanz.

C. albicans 1386 wurde mit verschiedenen Konzentrationen Ambruticin VS-3, Pyrrolnitrin und Myxothiazol kultiviert und der Sauerstoffgehalt im Medium gemessen (Kap. 2.2.4). Parallel wurde die Vermehrungsrate der Hefe detektiert (Kap. 2.2.1, 2.2.3.2).

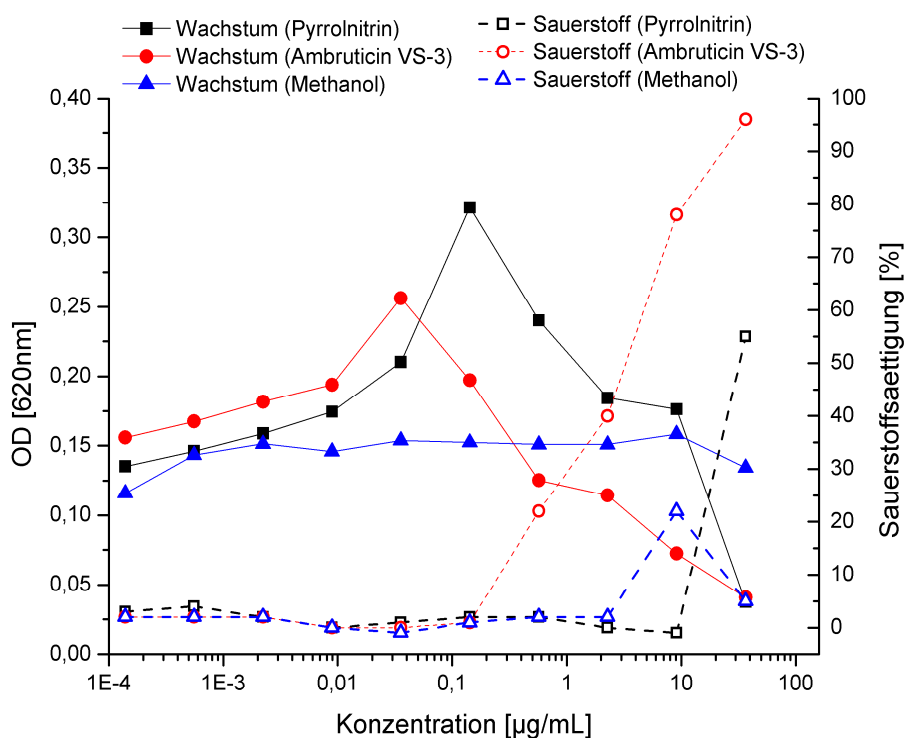


Abb. 19: Wachstum und Sauerstoffverbrauch von *C. albicans* 1386 behandelt mit Ambruticin VS-3 und Pyrrolnitrin. Die Hefen wurden für fünf Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Ambruticin VS-3, Pyrrolnitrin sowie der Lösungsmittelkontrolle (Methanol) in 96Well-Mikrotiterplatten kultiviert und die OD₆₂₀ bestimmt (geschlossene Symbole). Dargestellt ist die OD_{620nm} mit abgezogenen Blindwert (YPD-Medium). Außerdem wurde der Sauerstoffgehalt im Medium ermittelt (offene Symbole).

Der Sauerstoffverbrauch und die Vitalität zeigten eine Korrelation der Substanzen Ambruticin VS-3 und Pyrrolnitrin (Abb. 19). Bei einer Ambruticin VS-3-Konzentration von 0,6 $\mu\text{g/mL}$ zeigte sich eine Wachstumsreduktion und die Sauerstoffsättigung lag bei 20 % (Abb. 19). Je mehr die Substanzkonzentration anstieg, desto mehr reduzierte sich die Vitalität der Hefen und umso höher war die Sauerstoffsättigung. Ein ähnliches Ergebnis war bei der Pyrrolnitrin-Behandlung zu sehen, mit dem Unterschied, dass erst ab einer Konzentration von $>10 \mu\text{g/mL}$ eine Wachstumsreduktion und folglich eine Steigerung der Sauerstoffsättigung beobachtet wurde.

Im Vergleich dazu zeigte die Behandlung mit Myxothiazol keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefen (Abb. 20), aber ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ stieg der Gehalt an gelöstem Sauerstoff durch die Hemmung der Atmungskette an (Abb. 20). Bei der höchsten Konzentration lag der Sauerstoffgehalt bei fast 90 %. Die Methanolkontrolle zeigte zwar einen leichten Abfall der optischen Dichte bei den höchsten Konzentrationen, allerdings lag die Sauerstoffsättigung nach fünf Stunden konstant bei knapp 5%.

Somit zeigte sich bei Myxothiazol ein deutlicher Einfluss auf den Sauerstoffgehalt, der

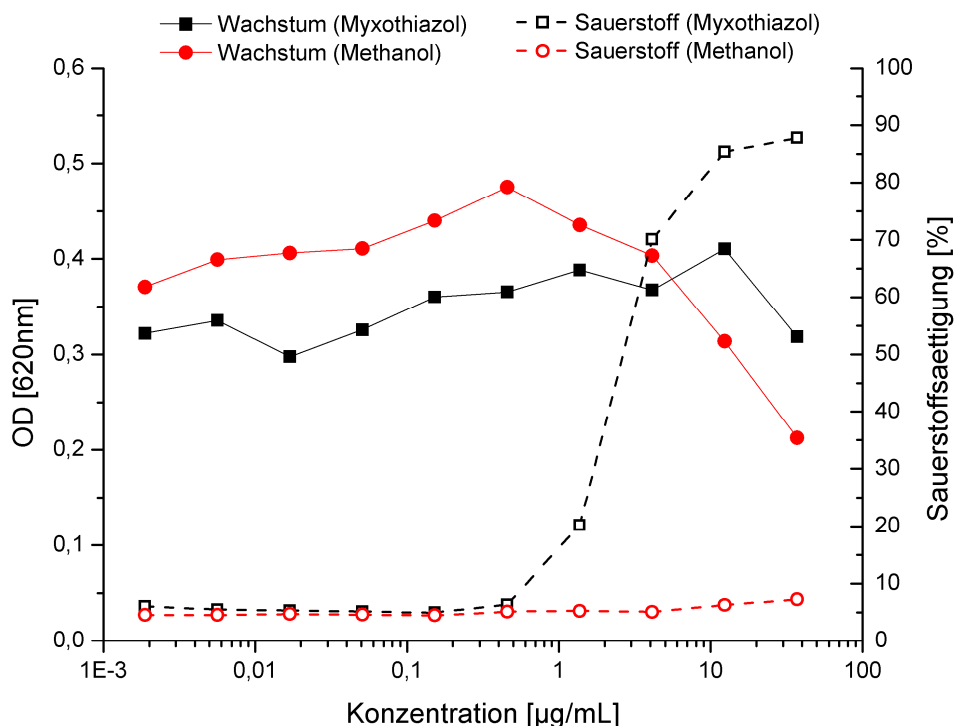


Abb. 20: Wachstum und Sauerstoffverbrauch von *C. albicans* 1386 inkubiert mit Myxothiazol. Die Hefen wurden für fünf Stunden mit verschiedenen Myxothiazol-Konzentrationen sowie Methanol als Lösungsmittelkontrolle in 96Well-Mikrotiterplatten kultiviert und die OD₆₂₀ bestimmt. Die OD₆₂₀ ist als Differenz zum Blindwert (YPD-Medium) dargestellt (geschlossene Symbole). Zudem ist der Sauerstoffgehalt im Medium dargestellt (offene Symbole).

unabhängig von Einflüssen auf das Wachstum von *C. albicans* war. Bei Ambruticin VS-3 und Pyrrolnitrin korrelierte der Einfluss auf den Sauerstoffgehalt mit einer Beeinträchtigung des Wachstums.

3.3. Untersuchung der Phosphorylierung von Hog1 nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Fludioxonil

Osmotischer Stress führt in Hefen zur Aktivierung des HOG-Signalweges, in dessen Verlauf eine Reihe von Proteinen phosphoryliert werden (Kap. 1.3.2). Am Ende dieser Phosphorylierungskaskade steht die MAPK Hog1, welche in der phosphorylierten Form in den Zellkern wandert und dort die Expression von Genen induziert wird (Abb. 7). Von Ambruticin VS-3 und Fludioxonil ist bekannt, dass sie eine osmotische Stressantwort in filamentösen Pilzen auslösen (Motoyama *et al.*, 2005b; Noguchi *et al.*, 2007; Vetcher *et al.*, 2007; Dongo *et al.*, 2009).

Um zu überprüfen, ob auch in *C. albicans* die MAPK Hog1 durch die Behandlung von Ambruticin VS-3 und Fludioxonil phosphoryliert wird, wurden Proteinanalysen durchgeführt. Hierzu wurden die Stämme 1386 und CAF2-1 sowie die Deletionsstämme $\Delta cos1$ und $\Delta hog1$ verwendet und für 10 min mit Ambruticin VS-3 (1 $\mu\text{g/mL}$) und Fludioxonil (20 $\mu\text{g/mL}$) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Hefen sowie eine Behandlung mit dem Lösungsmittel Methanol. Da in der $\Delta hog1$ -Mutante das zu detektierende Protein fehlt, diente dieser Stamm nur als Kontrolle und blieb unbehandelt. Nach der Kultivierung der Hefen (Kap. 2.2.3.1) und anschließender Proteinisolierung (Kap. 2.2.7.1, 2.2.7.2, 2.2.7.3) wurden die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt (Kap. 2.2.7.4). Mittels Western-Blot (Kap. 2.2.7.5) wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und das Protein Hog1 sowie phosphoryliertes Hog1 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert (Kap. 2.2.7.6, 2.2.7.7).

Die Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit Ambruticin VS-3 bzw. Fludioxonil beim Stamm CAF2-1 im Vergleich zu den Kontrollen und im Vergleich zum Gesamtprotein von Hog1 zu einer erhöhten Phosphorylierung von Hog1 führten (Abb. 21). In der $\Delta cos1$ -Mutante wurde der Phosphorylierungsstatus von Hog1 durch die Testsubstanzen nicht beeinflusst und blieb unverändert. Wie erwartet konnte im Lysat von $\Delta hog1$ kein Hog1-Protein nachgewiesen werden.

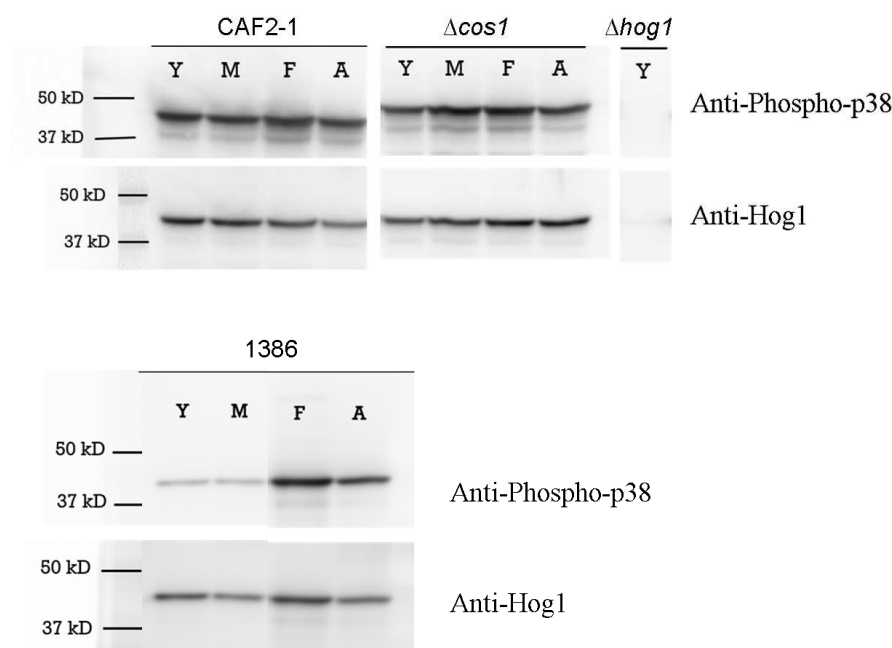


Abb. 21: Western-Blot zur Detektion von phosphoryliertem Hog1 (Anti-Phospho-p38 Antikörper) und Hog1 (Anti-Hog1 Antikörper). Der Proteingehalt betrug jeweils 25 µg. Folgende Hefestämme wurden verwendet: *C. albicans* CAF2-1, $\Delta cos1$, $\Delta hog1$ und der Stamm 1386. Die Hefen wurden mit Fludioxonil (F) [20 µg/mL] und Ambruticin VS-3 (A) [1 µg/mL] behandelt. Unbehandelte (Y) sowie mit Methanol (M) behandelte Hefen dienten als Kontrolle.

Der Stamm 1386 wurde ebenfalls mit Ambruticin VS-3 und Fludioxonil behandelt. Auch hier wurde eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der MAPK Hog1 bei der Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Fludioxonil beobachtet (Abb. 21).

3.4. Untersuchung der Genexpression in *C. albicans* nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A

Als Konsequenz der Aktivierung von Signalwegen kann in einem Organismus der Bedarf an bestimmten Proteinen steigen oder sinken. Dies wird unter anderem über die Transkription von Genen, auch Expression von Genen genannt, reguliert. Die Menge des von einem bestimmten Gen vorliegenden Transkriptes wird daher auch als Maß für die Aktivität des jeweiligen Gens verwendet. In den vorherigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Testsubstanzen Ambruticin VS-3 und Jerangolid A auch bei *C. albicans* zu einem Anstieg der Glycerinkonzentration führten und somit die Glycerinbiosynthese induzierten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die MAPK Hog1 durch die Behandlung mit Ambruticin VS-3 aktiviert wurde.

Daher sollte überprüft werden, ob sich die Auswirkung der Substanzen in *C. albicans* auf den HOG-Signalweg und die Glycerinbiosynthese ebenfalls in der Genexpression widerspiegeln, und ob die Behandlungen zu Veränderungen in der Expression von weiteren Genen führen.

3.4.1. Genexpressionsanalyse stressassoziiierter Gene in *C. albicans*

Im Fokus dieser Untersuchungen standen 70 ausgewählte Gene, die nach Literaturangaben in *C. albicans* bei diversen Stresssituationen reguliert werden (siehe Anhang 6.2). Diese Gene kodieren für Proteine, die in Stresssignalwegen sowie in metabolischen Prozessen involviert sind.

Um zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt Veränderungen in der Genexpression gut detektierbar sind, wurden Voruntersuchungen mit dem Stamm 1386 unter Behandlung mit Ambruticin VS-3 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Inkubationen von einer Stunde mit Ambruticin VS-3 zu signifikanten Veränderungen der Genexpression führten (nicht dargestellt). Daher wurden bei allen folgenden Untersuchungen die Hefen für diesen Zeitpunkt mit den Testsubstanzen inkubiert. Zu den untersuchten Stämmen zählten der Stamm 1386 und die $\Delta sit4$ -Mutante, da beide in den vorangegangenen Untersuchungen sensitiv auf Ambruticin VS-3 reagierten (Kap. 3.1). Des Weiteren wurde die $\Delta cos1$ -Mutante untersucht, um festzustellen, ob sich bei Abwesenheit des vermuteten Targets von Ambruticin VS-3 die Transkription von Genen verändert. Vergleichend dazu wurde der Referenzstamm CAF2-1 in die Untersuchungen einbezogen. Für jede Behandlung wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Als Kontrolle diente bei jedem Versuchsansatz eine Behandlung mit Methanol und bildete die Basis der Vergleichsanalyse. Mittels der ANOVA-Analyse wurden die drei Behandlungen untereinander verglichen und eine Signifikanz der einzelnen Gene ermittelt. Die Gene, die einen p -Wert $< 0,05$ besaßen, wurden als signifikant reguliert betrachtet (Kap. 2.2.8.7).

Bei der überwiegenden Zahl der 70 untersuchten Gene wurde durch die Substanzbehandlung in allen Stämmen eine hochregulierte Transkription beobachtet. *C. albicans* 1386 zeigte dabei mit 43 regulierten Genen die größte Veränderung im Expressionsprofil nach den Substanzbehandlungen (Abb. 22). Bei CAF2-1 veränderte sich die Expression von nur sieben Genen, bei $\Delta sit4$ waren es 10 Gene (Abb. 22). Bei der $\Delta cos1$ -Mutante wurde die Expression von keinem Gen signifikant verändert (nicht dargestellt).

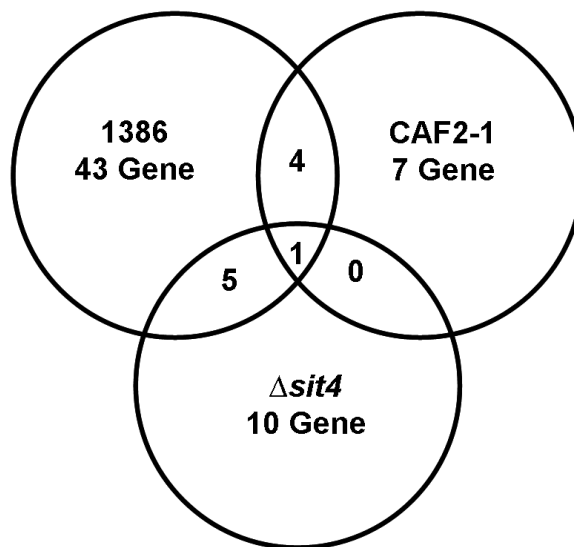


Abb. 22: Schematische Darstellung der Anzahl an signifikant hoch- und herunterregulierten Genen der *C. albicans*-Stämme 1386, CAF2-1 und $\Delta sit4$ nach einstündiger Inkubation mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.

Bei allen drei Stämmen wurde das Gen *GPD2*, kodierend für ein Enzym, dass die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-Phosphat katalysiert, signifikant hochreguliert (Tab. 10). Von den insgesamt sieben beim Stamm CAF2-1 hochregulierten Genen wurden vier auch beim Stamm 1386 hochreguliert (*SLN1*, *MKC1*, *PPZ1*, *TUP1*; siehe Tab. 9, Tab. 11). Fünf Gene zeigten sowohl beim Stamm 1386 als auch der $\Delta sit4$ -Mutante eine hochregulierte Aktivität (*SSK1*, *GUT1*, *RHR2*, *MLS1*, *OSM2*; siehe Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11).

Jedoch wurden auch acht Haushaltsgene beim Stamm 1386 (*ADA2*, *DST1*, *IPF4814*, *IPF5446*, *IPF7998*, *MDJ1*, *SSE1*, *DBP6*), eins bei CAF2-1 (*IPF7998*), zwei bei $\Delta sit4$ (*DBP6*, *IPF7998*) und vier bei $\Delta cos1$ (*ADA2*, *IPF5446*, *SSE1*, *FKH1*) signifikant reguliert (Kap. 2.2.8.7), was so nicht erwartet wurde.

Eine ausführliche Beschreibung der regulierten Gene erfolgt in den folgenden Kapiteln. Werte mit negativen Vorzeichen repräsentieren dabei herunterregulierte Gene und Werte ohne Vorzeichen zeigen hochregulierte Gene.

3.4.1.1. MAPK-Signalwege

C. albicans besitzt mehrere MAPK-Signalwege, die in Stresssituationen aktiviert werden. Dazu zählen der Mkc1-abhängige Signalweg, der Cek1-abhängige Signalweg sowie der HOG-Signalweg. Obwohl die Genexpressionsanalyse keine direkten Aussagen über die Aktivierung der an einem Signalweg beteiligten Proteine ermöglicht, liefern sie dennoch Hinweise auf den Bedarf der jeweiligen Proteine in der Zelle.

Für den Stamm 1386 konnte gezeigt werden, dass durch Ambruticin VS-3 und Jerangolid A die Expression von Genen aus allen drei MAPK-Signalwegen signifikant hochreguliert wurde (Tab. 9). Dazu gehören die Gene kodierend für die Osmosensoren (*SHO1*, *SLN1*), die Histidinkinasen (*SLN1*, *COS1*), die Antwortregulatoren (*SSK1*, *SKN7*), die MAPKKK (*STE11*, *SSK2*), die MAPKK (*PBS2*, *HST7*), MAPK (*HOG1*, *CEK1*, *MKC1*) und der Transkriptionsfaktor (*CPH1*). Die Behandlung mit Ambruticin VS-3 zeigte dabei im Vergleich zu Jerangolid A weitaus größere Effekte (Tab. 9).

Auch beim Stamm CAF2-1 wurde die Hochregulation des Gens des Osmosensors *SLN1* aus dem HOG-Signalweg sowie des Gens *MKC1* der MAPK aus dem Mkc1-abhängigen

Tab. 9: Expression von *C. albicans*-Genen der MAPK-Signalwege nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A. Dargestellt ist die Regulation der Gene von 1386, CAF2-1 und $\Delta sit4$ nach einstündiger Inkubation mit den Substanzen.

Oligo_ID	Gen_ID	Gen_Symbol	Signalintensität - Log Ratio				p-Wert<0.05
			Ambruticin VS-3		Jerangolid A		
			Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	
C. albicans 1386							
orf19.4772	CA02348_01	SSU81 (SHO1)	1.56	0.26	0.75	0.1	0.000
AB006362	CA10114_01	SLN1	1.67	0.02	0.8	0.17	0.001
AL033396	CA10252_01	(COS1)	1.91	0.05	0.67	0.1	0.010
AF084608	CA10047_01	SSK1	2.09	0.07	0.79	0.48	0.004
orf19.971	CA05550_01	SKN7	1.55	0.14	0.54	0.07	0.000
orf19.3776	CA01472_01	SSK2	1.27	0.19	0.31	0.28	0.015
orf19.844	CA02192_01	STE11 IPF3329	1.02	0.13	0.71	0.43	0.004
orf19.7388	CA05837_01	(PBS2)	0.99	0.27	0.47	0.09	0.005
U72980	CA10100_01	STE7 (HST7)	0.76	0.18	0.59	0.23	0.014
M76585	CA10042_01	ERK1 (CEK1)	2.46	0.35	0.78	0.24	0.000
X90586	CA10147_01	HOG1	1.72	0.2	0.73	0.01	0.000
X76708	CA10161_01	MKC1	3.78	0.22	1.03	0.27	0.000
U15152	CA10177_01	CPH1	1.93	0.11	0.95	0.79	0.006
C. albicans CAF2-1							
AB006362	CA10114_01	SLN1	0.59	0.01	0.81	0.15	0.030
X76708	CA10161_01	MKC1	1.02	0.59	0.38	0.54	0.030
C. albicans Δsit4							
AF084608	CA10047_01	SSK1	0.66	0.15	1.1	0.25	0.040

Signalweg beobachtet. Bei der $\Delta sit4$ -Mutante wurde der Antwortregulator *SSK1* aus dem HOG-Signalweg bei beiden Behandlungen signifikant reguliert.

3.4.1.2. Glycerinbiosynthese

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte ein Anstieg der extrazellulären Glycerinkonzentration nach der Behandlung mit den Testsubstanzen ermittelt werden. Zu den wichtigen Enzymen, die an der Glycerinbiosynthese beteiligt sind, gehören Gpp1/Rhr2, Gpd1 und Gpd2 (Kap. 1.3.3). Die für diese Enzyme kodierenden Gene wurden beim Stamm 1386 bei den Substanzbehandlungen signifikant hochreguliert (Tab. 10). Zudem wurden die Gene kodierend für einen Glycerintransporter (*IPF1764*) und einer am Glycerinabbau beteiligten Glycerinkinase (*GUT1*) ebenfalls hochreguliert. Der Vergleich zwischen beiden Behandlungen ergab, dass die Signalintensitäten bei Ambruticin VS-3 höher als bei Jerangolid A waren.

Beim Stamm CAF2-1 und der $\Delta sit4$ -Mutante wurde die Hochregulation des Gens *GPD2* ebenfalls beobachtet. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei der $\Delta sit4$ -Mutante das Gen *GPP1/RHR2* des Glycerinenzyms ebenfalls verstärkt exprimiert wurde. Die $\Delta sit4$ -Mutante zeigte im Unterschied zu den anderen Stämmen bei Ambruticin VS-3 eine verstärkte Expression von Genen, deren entsprechenden Proteine an der Glycerindegradation beteiligt sind (*GUT1*, *GUT2*). Nach Jerangolid A-Behandlung wurden diese Gene allerdings reduziert exprimiert.

Tab. 10: Expression von *C. albicans* Genen der Glycerinbiosynthese nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A. Dargestellt ist die Regulation der Gene von 1386, CAF2-1 und $\Delta sit4$ nach einstündiger Inkubation mit den Substanzen.

Oligo_ID	Gen_ID	Gen_Symbol	Signalintensität - Log Ratio				p-Wert<0.05
			Ambruticin VS-3		Jerangolid A		
			Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	
C. albicans 1386							
orf19.691	CA01154_01	GPD2	3.98	0.14	1.62	0.16	0.000
orf19.558	CA01235_01	GUT1	1.26	0.14	0.43	0.07	0.000
orf19.1756	CA02416_01	GPD1	0.75	0.11	0.43	0.22	0.049
orf19.4985	CA05384_01	IPF1764	1.38	0.08	0.75	0.47	0.011
orf19.5437	CA05946_01	RHR2 (GPP1)	3.86	0.14	1.75	0.27	0.003
C. albicans CAF2-1							
orf19.691	CA01154_01	GPD2	1.52	0.42	0.85	0.88	0.020
C. albicans Δsit4							
orf19.691	CA01154_01	GPD2	1.34	0.31	0.91	0.41	0.006
orf19.558	CA01235_01	GUT1	0.37	0.30	-0.55	0.21	0.024
orf19.3133	CA03604_01	GUT2	0.44	0.27	-1.05	0.08	0.002
orf19.5437	CA05946_01	RHR2 (GPP1)	1.62	0.84	2.12	0.05	0.032

3.4.1.3. Metabolismus

Metabolismus bezeichnet die Gesamtheit aller chemischen Prozesse, die in Lebewesen ablaufen (Campbell, 1998). Veränderungen in der Umgebung können Anpassungen von metabolischen Reaktionen erforderlich machen. Ein Beispiel dafür ist die Glycerinbiosynthese, die bei osmotischen Stressbedingungen induziert wird, um ein Überleben des Organismus in dieser Situation zu sichern. Voraussetzung für eine Glycerinbildung ist die Bereitstellung ausreichender Mengen von Glucose als Ausgangsmaterial und die ausreichende Verfügbarkeit von Energiequellen. Daher werden nicht nur einzelne, sondern mehrere Prozesse aktiviert, die letztendlich die Anpassung und damit das Überleben an das neue Milieu gewährleisten.

Da gezeigt wurde, dass Ambruticin VS-3 und Jerangolid A die Glycerinbiosynthese stimuliert (Kap. 3.2.1), sollte auch geprüft werden, welche Gene aus weiteren Prozessen betroffen sein könnten.

Beim Stamm 1386 wurden insgesamt 25 Gene durch die Testsubstanzen hochreguliert (Tab. 11). Hierzu zählen Gene aus Prozessen wie der Glykolyse (*PGK1*, *FBP1*), dem Citratzyklus (*MLS1*, *OSM2*) und der Atmungskette (*CBR1*, *CYT1*) (Tab. 11). Außerdem wurden Gene stärker exprimiert, deren Proteine an filamentösem Wachstum (*CLA4*, *PHR1*, *TUP1*) sowie der Virulenz (*PPZ1*) beteiligt sind. Erwähnenswert ist die geringe Signalintensität, die bei Jerangolid A im Vergleich zu Ambruticin VS-3 deutlich erkennbar war.

Der Stamm CAF2-1 zeigte bei beiden Behandlungen vier Gene, die hochreguliert wurden. Davon waren zwei Gene auch beim Stamm 1386 verstärkt exprimiert (*PPZ1*, *TUP1*) (Tab. 11). Die $\Delta sit4$ -Mutante zeigte bei den Behandlungen fünf Gene mit signifikanter Regulation. Vier Gene wurden dabei hochreguliert und ein Gen wurde in beiden Behandlungen reduziert exprimiert (Tab. 11). Es zeigten sich zwei Übereinstimmungen von Genen beim Stamm 1386 und der $\Delta sit4$ -Mutante, wo bei beiden die Gene *MLS1* und *OSM2* hochreguliert wurden.

Tab. 11: *C. albicans*-Gene aus diversen Prozessen reguliert durch Ambruticin VS-3 und Jerangolid A.
Dargestellt ist die Regulation der Gene von 1386, $\Delta sit4$ und $\Delta cos1$ nach einstündiger Inkubation mit den Substanzen.

Oligo_ID	Gen_ID	Gen_Symbol	Signalintensität - Log Ratio				p-Wert<0.05
			Ambruticin VS-3		Jerangolid A		
			Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	
C. albicans 1386							
CAU25180	CA00363_01	PGK1	1.22	0.14	0.44	0.08	0.026
orf19.5753	CA00870_01	STL1	2.98	0.19	1.58	0.02	0.000
orf19.2666	CA00974_01	MSN5.5f	1.20	0.18	0.43	0.03	0.009
orf19.2665	CA00975_01	MSN5.3f	1.44	0.22	0.47	0.42	0.016
orf19.11010	CA01186_01	CYT1	0.87	0.03	0.03	0.17	0.001
orf19.1801	CA01286_01	CBR1	1.12	0.03	0.51	0.19	0.006
orf19.789	CA01699_01	PYC2.exon2	1.37	0.10	0.24	0.30	0.007
orf19.3227	CA01724_01	FTH2	0.97	0.21	0.73	0.38	0.010
orf19.1652	CA01799_01	POX4	0.99	0.25	0.62	0.16	0.006
orf19.4753	CA02372_01	PFK26	0.84	0.00	0.05	0.30	0.003
orf19.3710	CA03196_01	YHB3	1.76	0.08	0.64	0.79	0.007
orf19.3575	CA03522_01	CDC19	0.90	0.14	0.55	0.19	0.001
orf19.726	CA03720_01	PPZ1	2.04	0.17	1.19	1.02	0.019
orf19.4833	CA04811_01	MLS1	1.73	0.07	0.62	0.04	0.005
orf19.5263	CA05077_01	SER33	1.47	0.19	0.11	0.08	0.047
orf19.7021	CA05320_01	GPH1	2.21	0.15	1.05	0.28	0.001
orf19.5005	CA05368_01	OSM2	1.34	0.03	0.46	0.13	0.006
orf19.5406	CA05915_01	IPF20031	0.94	0.16	0.87	0.10	0.000
AJ243306	CA10019_01	FBP1	2.37	0.50	1.06	0.72	0.005
AF031478	CA10051_01	SOD2	1.46	0.20	0.27	0.24	0.000
U87996	CA10129_01	CLA4	1.60	0.02	0.84	0.40	0.001
AB006327	CA10133_01	CTA1	2.05	0.13	0.84	0.52	0.001
AF005741	CA10135_01	TUP1	1.40	0.08	0.34	0.15	0.001
X81025	CA10160_01	HSP90	1.02	0.34	0.05	0.15	0.011
M90812	CA10174_01	PHR1	1.99	0.25	1.16	0.48	0.005
C. albicans CAF2-1							
AF046872	CA00144_01	SOD1.3	0.88	0.08	1.77	0.78	0.030
orf19.726	CA03720_01	PPZ1	0.66	0.23	1.09	0.07	0.020
orf19.5363	CA05662_01	SAT2	0.79	0.59	0.76	0.29	0.040
AF005741	CA10135_01	TUP1	0.63	0.23	0.32	0.07	0.040
C. albicans Δsit4							
CAU38534	CA00432_01	TUB1.3	-0.03	0.31	-0.67	0.39	0.040
orf19.4363	CA01391_01	SGD1.3f	0.14	0.22	0.55	0.13	0.030
orf19.4833	CA04811_01	MLS1	0.92	0.07	0.47	0.51	0.040
orf19.5005	CA05368_01	OSM2	1.11	0.05	0.05	0.81	0.040
orf19.7637	CA06207_01	YHB2	1.19	0.42	0.6	0.54	0.050

3.4.2. Transkriptomanalyse von *C. albicans* nach Behandlung mit Ambruticin VS-3

Ergänzend zu den vorherigen Untersuchungen zur Regulation ausgewählter stress-assoziiierter Gene durch Ambruticin VS-3 (Kap. 3.4.1), sollten im Folgenden die Untersuchungen der Genexpression auf das gesamte Transkriptom mittels Ganz-Genom-DNA-Chips erweitert werden (Kap. 2.2.8.2).

In diesen Untersuchungen wurden die Stämme 1386, CAF2-1, $\Delta sln1$ und $\Delta cos1$ eingesetzt und mit Ambruticin VS-3 und Methanol als Kontrolle kultiviert (Kap. 2.2.3.1). Die Markierung der mRNA wurde zunächst nach Anleitung des Herstellers der *C. albicans* Genom-DNA-Chips durchgeführt. Da jedoch keine Signale erzeugt und das Problem nicht gelöst werden konnte, wurde schließlich die Methode der vorherigen Analysen mit den stressassoziierten Arrays angewandt (Kap. 2.2.8). Insgesamt blieben die Signalintensitäten jedoch niedrig. Daher wurden nur die Spots in der Auswertung berücksichtigt, die eine Signifikanz von $p < 0,05$ Unterschied zwischen Ambruticin VS-3 und der Methanolkontrolle aufwiesen und die zusätzlich um mehr als zweifach reguliert wurden. Mit Hilfe der *C. albicans* Datenbank wurden die signifikant regulierten Gene verschiedenen zellulären Prozessen zugeordnet (<http://www.candidagenome.org/>). Dabei wurden die Gene aus den Prozessen: Stressantwort, Signaltransduktion, filamentöses Wachstum/ Hyphenbildung und Zellwandorganisation/ -biosynthese näher betrachtet (Tab. 12).

Die Untersuchungen zeigten, dass beim Stamm 1386 insgesamt 62 Gene hochreguliert und 136 Gene reduziert exprimiert wurden. Von den insgesamt 198 regulierten Genen konnten 28 Gene (davon 16 hochreguliert, 12 herunterreguliert) den oben genannten Prozessen zugeordnet werden (Tab. 12). Interessanterweise wurden 12 Gene aus dem Bereich der Stressantwort hochreguliert sowie fünf Gene der Zellwandorganisation/-biosynthese. Auffällig war, dass acht Gene herunterreguliert wurden, die mit filamentösem Wachstum assoziiert sind. Im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen aus Kap. 3.4.1 konnte für den Stamm 1386 die verstärkte Expression der Gene *GPPI*, *GPD2* und *CEK1* in diesen Experimenten bestätigt werden.

CAF2-1 zeigte insgesamt 46 Gene, die alle hochreguliert wurden, wovon 14 Gene den bereits erwähnten Kategorien zugeordnet wurden (Tab. 12). Bei der $\Delta sln1$ -Mutante wurden 48 Gene hoch- und 14 Gene herunterreguliert. Neun der regulierten Gene stammten aus einer der oben erwähnten Kategorien, wovon sieben hochreguliert und zwei herunterreguliert wurden (Tab. 12). Bei $\Delta cos1$ wurden 15 Gene reguliert (neun Gene

Tab. 12: Regulierte Gene nach einstündiger Ambruticin VS-3-Behandlung von *C. albicans* 1386, CAF2-1, $\Delta sln1$ und $\Delta cos1$ (Genannotation siehe Tab. 16)

	1386		CAF2-1		$\Delta sln1$		$\Delta cos1$	
<i>Regulation</i>	<i>hoch</i>	<i>herunter</i>	<i>hoch</i>	<i>herunter</i>	<i>hoch</i>	<i>herunter</i>	<i>hoch</i>	<i>herunter</i>
Signaltransduktion	CEK1 HAC1 BCK1	PEA2			CMK2 HAC1 BCK1			
Stressantwort	orf19.5830 PRB1 DDR48 GPD2 TRP99 HSP12 HAC1 GCY1 BCK1 GPP1 APR1 RIM20	CTF4 HTA1 POL30	DDR48 OXR1 HSP12 GCV1 REV1 LAS17 orf19.5276		DDR48 HAC1 REV1 BCK1 HTA1		ATG9 orf19.5620 HCH1	
filamentöses Wachstum und Hyphenbildung	CEK1 GFA1	NOC2 IPT1 YVH1 FGR41 CSI2 DIP2 BRE1 NOP58	PHR1 KEX2 LAS17 FGR34		MRP2		PMT2	
Zellwandorganisation und -biosynthese	PMI1 PIR1 ECM15 CEK1 GFA1		CHS8 CWH41 PHR1 PMR1 BUD7		PIR1 CRH1			

herunter-, sechs Gene hochreguliert), wovon vier Gene den erwähnten Kategorien zugeordnet wurden (Tab. 12).

Insgesamt konnten zwischen den beobachteten Veränderungen in den Genexpressionsmustern der verschiedenen Stämme nur wenige Übereinstimmungen festgestellt werden. So wurde das Gen *DDR48* beim Stamm 1386, CAF2-1 und der $\Delta sln1$ -Mutante hochreguliert und die beiden Stämme 1386 und CAF2-1 zeigten eine erhöhte Transkription der Gene *HSP12* und *GCV1* (Tab. 12). Außerdem wurden drei Gene (*HAC1*, *BCK1*, *PIR1*) sowohl beim Stamm 1386 als auch bei der $\Delta sln1$ -Mutante hochreguliert. Der Referenzstamm CAF2-1 und die $\Delta sln1$ -Mutante wiesen eine erhöhte Expression des Gens *REV1* auf. Die $\Delta cos1$ -Mutante zeigte keine Übereinstimmung in der Genexpression zu den anderen Stämmen (Tab. 12).

3.5. Untersuchung von Ambruticin VS-3 im Phagozytose-Assay

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zeigten unter anderem, dass bei der Mutante Δcos1 , im Gegensatz zu den Stämmen 1386 und CAF2-1, nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 weder ein Effekt auf die Aktivierung der MAPK Hog1 noch auf die Glycerinproduktion oder die Genexpression beobachtet werden konnte (Kap. 3.2.1, 3.3, 3.4). Dies lässt vermuten, dass es sich bei Cos1 um das Target von Ambruticin VS-3 handelt. Da die Histidinkinase Cos1 nicht nur eine Rolle im HOG-Signalweg, sondern auch in der Virulenz des Hefepilzes spielt (Yamada-Okabe *et al.*, 1999), sollte überprüft werden, ob Ambruticin VS-3 die Pathogenität von *C. albicans* beeinflusst.

Während einer *Candida*-Infektion werden als Teil der angeborenen Immunantwort des Wirtes sogenannte Phagozyten („Fresszellen“) aktiviert, welche Pathogene erkennen, aufnehmen (phagozytieren) und intrazellulär abbauen. Zu diesen Immunzellen gehören unter anderem die Makrophagen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Ambruticin VS-3 auf die Phagozytose von *C. albicans* durch die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7 untersucht. Hierzu wurden die RAW264.7-Zellen sowie verschiedene *C. albicans*-Stämme in einem quantitativen in-vitro-Infektionsmodell (Kap. 2.2.9) eingesetzt. Bei den untersuchten Hefestämmen handelte es sich um *C. albicans* 1386, da Ambruticin VS-3 bei diesem Stamm zuvor die größten Effekte zeigte sowie um die Mutante Δcos1 , da hier das vermutete Target für Ambruticin VS-3 fehlt. Im Vergleich zur

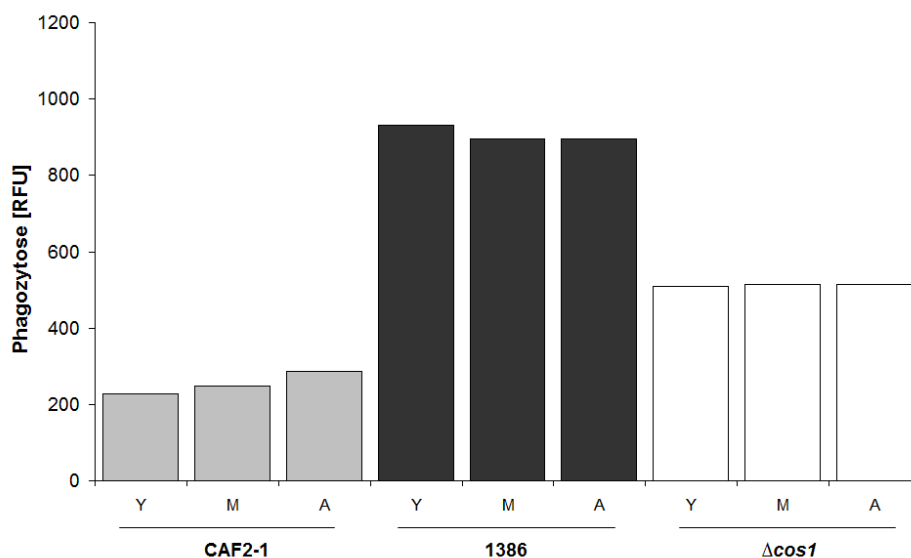


Abb. 23: Phagozytose von 1386, CAF2-1 und Δcos1 durch RAW264.7-Makrophagen nach 30 min Kokultivation. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.2.9 beschrieben. Die Substanzzugabe erfolgte mit dem Infektionsstart. Y=unbehandelt, M=Methanol, A=Ambruticin VS-3

Mutante wurde zudem der Referenzstamm CAF2-1 getestet. Außerdem wurden jeweils drei verschiedene Ansätze der Substanzzugabe untersucht.

Beim ersten Ansatz wurde Ambruticin VS-3 sowie das Lösungsmittel Methanol als Kontrolle zusammen mit den Hefen zu den Makrophagen gegeben (Abb. 23), wodurch die Substanz nur eine kurze Wirkungszeit besaß. Bei keinem der untersuchten Stämme konnte ein Einfluss von Ambruticin VS-3 festgestellt werden (Abb. 23).

Im zweiten Ansatz wurden die Hefen mit Ambruticin VS-3 über Nacht vorinkubiert, und die Testsubstanz wurde zusätzlich zum Infektionsstart hinzugegeben (Abb. 24A). Dabei zeigte sich nach 30 min Inkubation der Hefen mit den RAW264.7-Makrophagen, dass beim Stamm 1386 die Behandlung mit Ambruticin VS-3 zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytose führte. Bei CAF2-1 und $\Delta cos1$ konnten hingegen keine signifikanten Veränderungen durch die Ambruticin VS-3-Behandlung im Vergleich zur Methanol-Kontrolle beobachtet werden.

Im dritten Ansatz wurde Ambruticin VS-3 mit den Hefen ebenfalls über Nacht inkubiert, allerdings wurde zum Infektionsstart keine Testsubstanz hinzugegeben (Abb. 24B). Der eingesetzte Stamm 1386 zeigte wie im zweiten Ansatz nach 30 min eine gesteigerte Effizienz der Phagozytose durch die Behandlung mit Ambruticin VS-3. Bei der $\Delta cos1$ -Mutante konnte erneut kein Einfluss beobachtet werden.

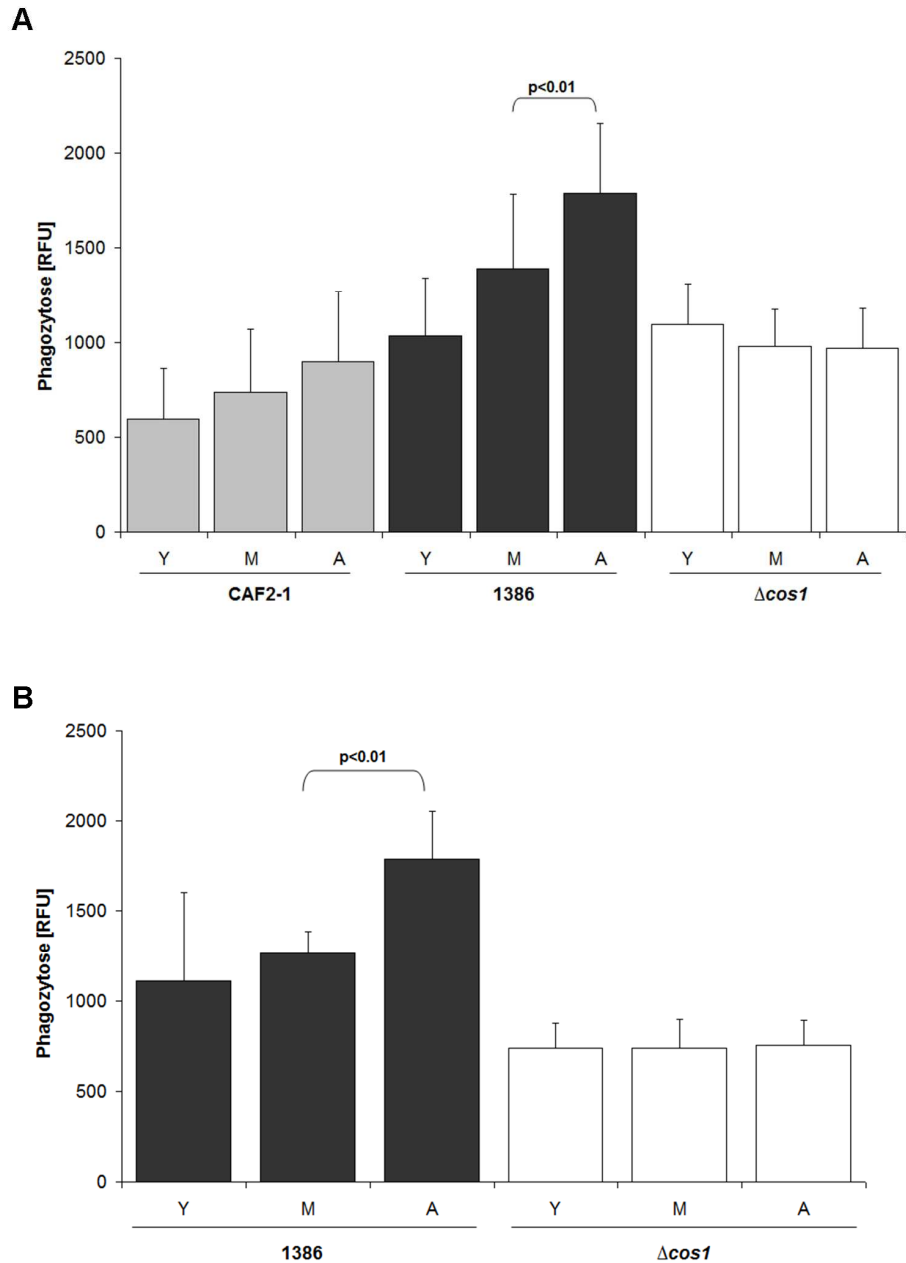


Abb. 24: Phagozytose von *C. albicans* durch RAW264.7-Makrophagen nach 30 min Koinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. A) Inkubation mit *C. albicans* CAF2-1, 1386 und $\Delta cos1$. Die Hefen wurden mit den Substanzen vorinkubiert und zum Infektionsstart wurde erneut Substanz hinzugegeben. B) *C. albicans* 1386 und $\Delta cos1$ wurden mit den Substanzen nur vorinkubiert und es erfolgte keine weitere Substanzzugabe. Die Signifikanz wurde aus der Vergleichsanalyse (Student's T-Test) zur Behandlung mit dem Lösemittel ermittelt. Y=unbehandelt, M=Methanol, A=Ambruticin VS-3

4. Diskussion

4.1. Targetidentifizierung der Testsubstanzen: Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden

In verschiedenen Studien wurde von Histidinkinasen Typ III als Target für Ambruticin VS-3 und Fludioxonil in filamentösen Pilzen berichtet. Dabei wurde nicht nur gezeigt, dass Mutationen in den jeweiligen Genen die Sensitivität beeinflussen (Dongo *et al.*, 2009; Ochiai *et al.*, 2001), sondern auch dass durch Transformation von *S. cerevisiae* mit den entsprechenden Genen die Sensitivität für diese Verbindungen transferiert werden kann (Vetcher *et al.*, 2007; Motoyama *et al.*, 2005b; Dongo *et al.*, 2009). Dies wurde am Beispiel der Histidinkinase Hik1 aus *M. grisea* (Vetcher *et al.*, 2007) und der Histidinkinase AbNik1 aus *Alternaria brassicicola* demonstriert (Dongo *et al.*, 2009). Eine defekte Histidinkinasedomäne oder eine Mutation des Phosphoakzeptorrests zur Inaktivierung der Antwortregulator-domäne verursachen jeweils die Aufhebung der Sensitivität gegenüber Ambruticin VS-3 (Vetcher *et al.*, 2007).

Auch der humanpathogene Hefepilz *C. albicans* besitzt ein Homolog der Histidinkinase Typ III, die als Nik1/Cos1 bezeichnet wird. Es ist bekannt, dass die Deletion von Nik1/Cos1 nicht letal ist, auch nicht die Doppeldeletion mit Chk1, wohl aber die Doppeldeletion mit Sln1 (Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Zudem wurde in der Literatur postuliert, dass Cos1 in die Hyphenbildung involviert ist (Alex *et al.*, 1998).

Die Untersuchungen in *C. albicans* mit den Testsubstanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil sind nicht sehr zahlreich und gehen nur in einzelnen Fällen über eine IC₅₀-Bestimmung hinaus. Daher wurde in dieser Arbeit Untersuchungen mit den Testsubstanzen an *C. albicans* durchgeführt, um eingehender zu überprüfen, welche Wirkung die Testsubstanzen auf den humanpathogenen Hefepilz haben. Da es in der Literatur Hinweise gibt, die einen Einfluss auf die osmotische Stressantwort vermuten lassen (Knauth & Reichenbach, 2000; Pilonel & Meyer, 1997), sollte der HOG-Signalweg in *C. albicans* näher betrachtet werden.

4.1.1. Unterschiedliches Wachstumsverhalten der *C. albicans*-Stämme nach Substanzbehandlung

4.1.1.1. Wildstämme

In der Literatur sind unterschiedliche Daten zur Wirksamkeit der ausgewählten Substanzen gegen Pilze zu finden. So wurde bei filamentösen Pilzen wie *N. crassa* von einer hohen Sensitivität gegen Fludioxonil ($IC_{50}=0,06 \mu\text{M}$) und Ambruticin VS-3 ($0,01\text{-}0,5 \mu\text{g/mL}$) berichtet (Pillonel & Meyer, 1997; Knauth & Reichenbach, 2000). Demgegenüber reagiert *C. albicans* auf Ambruticin ($MIC>100 \mu\text{g/mL}$) unempfindlich (Ringel *et al.*, 1977; Ringel, 1978), ist jedoch sensitiv gegenüber Fludioxonil ($1,6 \mu\text{g/mL}$) und Jerangolid A ($MIC=4,2 \mu\text{g/mL}$) (Ochiai *et al.*, 2002; Gerth *et al.*, 1996). Die Wirkung von Ambruticin wurde an 19 verschiedenen *C. albicans*-Stämmen getestet und es konnte gezeigt werden, dass es Stämme gibt, die bereits bei $2 \mu\text{g/mL}$ empfindlich reagieren, während andere erst bei $32 \mu\text{g/mL}$ oder noch höheren Konzentrationen eine Sensitivität zeigen (Shadomy *et al.*, 1978).

Daher sollte zunächst der Einfluss von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil auf das Wachstum von *C. albicans* überprüft werden. Die Wachstumsanalysen zeigten, dass bei *C. albicans* 1386 im Festmedium das Wachstum durch Ambruticin VS-3 zeitlich begrenzt reduziert war (Kap. 3.1) und auch im Flüssigmedium war innerhalb der ersten fünf Stunden bei allen drei Substanzen eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten (Abb. 12, Abb. 13). Im Gegensatz dazu wurde bei *C. albicans* CAF2-1 das Wachstum nicht durch die Substanzen Ambruticin-VS-3 und Jerangolid A beeinflusst, aber durch Fludioxonil in Flüssigmedium (Abb. 13, Abb.14A).

So weisen die Substanzen fungistatische Wirkungen auf, die allerdings Stamm-abhängig sind und dies bestätigte die Aussagen von Shadomy *et al.* (1978). Ein Grund dafür könnte der genetische Hintergrund sein, der bei den Stämmen zu unterschiedlichen Auswirkungen durch die Testsubstanzen führt. Fludioxonil beeinträchtigte im Gegensatz zu den Substanzen Ambruticin VS-3 und Jerangolid A sowohl das Wachstum vom Stamm 1386 als auch von CAF2-1 in Flüssigmedium. Das könnte bedeuten, dass Fludioxonil mehr als ein Target besitzt.

Zur Illustration der Wirksamkeit von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil wurden zusätzlich filamentöse Pilze mittels Agar-Diffusionstest getestet, die alle mit einer Wachstumshemmung reagierten (Tab. 8). Dabei wurden Hemmhofdurchmesser von 25 mm bis 59 mm erreicht und demonstrieren die spezies-abhängige Wirkung dieser Substanzen.

4.1.1.2. Mutanten

Da das Wachstum des Referenzstammes CAF2-1 nicht durch die Testsubstanzen Ambruticin VS-3 und Jerangolid A beeinflusst wurde, kann aus einem durch die Testsubstanzen nicht beeinträchtigten Wachstum der Deletionsmutanten nicht direkt auf den von den Substanzen getroffenen Signalweg geschlossen werden. Eine Hypersensitivität einer Mutante gegenüber einer der Substanzen würde jedoch auf eine kompensierende Wirkung des deletierten Gens mit dem Substanz-Target hindeuten.

In der Literatur wurde durch Untersuchungen von Histidinkinase-Deletionsmutanten bereits auf eine mögliche kompensatorische Beziehung zwischen den Histidinkinasen Cos1 und Sln1 hingedeutet, da die Deletion jeweils einer Histidinkinase möglich war, aber eine Mutante mit der Doppeldeletion Cos1/Sln1 nicht hergestellt werden konnte (Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Doppeldeletionen von Chk1 und Cos1 bzw. Chk1 und Sln1 waren dagegen möglich. Außerdem wurde beschrieben, dass unter osmotischen Stressbedingungen, induziert durch 1 M Sorbitol, das Wachstum von CAF2-1 und *Assk1* gehemmt wurde, wobei beide Stämme gleich sensitiv waren (Calera & Calderone, 1999). Auch die Mutanten *Δhog1*, *Δpbs2* und *Δgpp1* zeigten nach Behandlung mit Sorbitol bzw. Natriumchlorid einen osmosensitiven Phänotyp (San Jose *et al.*, 1996; Arana *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2005).

Bei der Untersuchung der Testsubstanzen reagierten die Deletionsmutanten *Assk1*, *Δpbs2*, *Δhog1* und *Δcos1* wie der Referenzstamm CAF2-1, und auch bei der *Δchk1*-Mutante wurde nur eine leichte Wachstumsreduktion beobachtet. Die *Δgpp1*-Mutante verhielt sich nach Behandlung mit Fludioxonil ebenfalls wie der Referenzstamm (Abb. 13). Somit können anhand des Wachstumsverhaltens dieser Mutanten keine genauen Rückschlüsse auf die Wirkung der Testsubstanzen gezogen werden.

Dagegen war die *Δsln1*-Mutante ähnlich sensitiv wie der Stamm 1386, zeigte also eine deutliche, zeitlich begrenzte Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit durch alle drei Testsubstanzen sowohl im festen als auch im flüssigen Medium (Tab. 8, Abb. 14B). Das könnte ein Hinweis sein, dass die Testsubstanzen den HOG-Signalweg beeinflussen.

Bei der *Δsit4*-Mutante wurde ein Wachstumsstillstand sowohl bei Ambruticin VS-3 als auch bei Jerangolid A im festen Medium festgestellt, wobei die Sensitivität gegenüber Ambruticin VS-3 höher war als gegen Jerangolid A gemessen an den Hemmhofdurchmessern (Tab. 8). Die Wachstumshemmung durch Fludioxonil war wiederum zeitlich begrenzt. Die *Δsit4*-Mutante zeigte prinzipiell eine niedrige Wachstumsrate (Lee *et al.*,

2004), so dass möglicherweise auch unspezifische Effekte zu den beobachteten Substanzwirkungen geführt haben könnten.

Die Tatsache, dass einige *C. albicans*-Stämme durch Wachstumsreduktion auf die ausgewählten Testsubstanzen reagierten, zeigte, dass das Target für die Substanzen vorhanden ist, das Ansprechen auf die Wirkstoffe jedoch in den verschiedenen genetischen Hintergründen (1386 vs CAF2-1) zu unterschiedlichen Auswirkungen führte. Aus diesem Grund wurden weitere Parameter untersucht, um die Wirkung der Substanzen auch in den anderen Deletionsmutanten erfassen zu können. Zu Beginn der Arbeit war von Fludioxonil und Ambruticin VS-3 bereits bekannt, dass sie in verschiedenen Pilzen zur Glycerinakkumulation führen (Ochiai *et al.*, 2002; Knauth & Reichenbach, 2000). Daher wurde der Einfluss auf die Glycerinbiosynthese und weiterer Metabolite von *C. albicans* studiert.

4.1.2. Einfluss der Substanzen auf die Glycerinbiosynthese in *C. albicans*

Osmotischer Stress resultiert aus der Erhöhung der Konzentration an gelösten Teilchen in der Umgebung eines Organismus im Vergleich zum Zellinneren. Durch die Erhöhung des Zucker- oder Salzgehaltes im Medium („hypertonische“ Bedingungen) kann osmotischer Stress erzeugt werden. In diesem Fall wird der Zelle Wasser entzogen, um die Konzentrationsverhältnisse zwischen Umgebung und Zellinneren auszugleichen. Um dem Wasserverlust entgegenzuwirken, produzieren Hefen unter osmotischen Stressbedingungen unter anderem Glycerin als Osmolyt, das in der Zelle verbleibt und so die intrazellulären Konzentrationen gelöster Substanzen erhöht. Die Regulation der Glycerinbiosynthese als Antwort auf osmotischen Stress erfolgt in *S. cerevisiae* und anderen Pilzen über die Aktivierung des HOG-Signalweges (Kap. 1.3.2).

Glycerin ist nicht nur als Osmolyt von Bedeutung, sondern außerdem das wichtigste Nebenprodukt der alkoholischen Gärung (Kap. 1.3.3). Bei ausreichend hohen Glucosekonzentrationen finden in *S. cerevisiae* Gärprozesse nicht nur unter anaeroben, sondern auch unter aeroben Bedingungen statt. In anderen Hefen erfolgt bei Sauerstoffanwesenheit die Energiegewinnung und die Einstellung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes, das heißt Oxidation des durch metabolische Prozesse gebildeten NADH, im Wesentlichen über die Atmungskette. Unter anaeroben Bedingungen wird auch hier die Glycerinproduktion aktiviert, um überschüssiges NADH zu oxidieren. Daher wäre zu erwarten, dass auch bei Beeinträchtigungen der Atmungskette erhöhte Glycerinkonzentrationen zu finden sind, die dann allerdings von erhöhten Ethanolkonzentrationen und einem reduzierten Sauerstoffverbrauch begleitet sein sollten.

Von Fludioxonil und Ambruticin VS-3 war bereits bekannt, dass sie zur Glycerinakkumulationen in *C. albicans* (Ochiai *et al.*, 2002) bzw. *H. anomala* (Knauth & Reichenbach, 2000) führen. Diese Untersuchungen waren aber nicht von der Bestimmung anderer metabolischer Parameter begleitet worden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nur der zeitliche Verlauf der Glycerinkonzentration in den Kulturüberständen bestimmt, sondern auch die Ethanolkonzentration und der im Medium gelöste Sauerstoff. Zur Kontrolle und zum Vergleich einer Veränderung der Ethanolkonzentration und des gelösten Sauerstoffs wurde außerdem Myxothiazol, ein Atmungsketteninhibitor, und Pyrrolnitrin in die Untersuchungen einbezogen. Pyrrolnitrin ist wie Fludioxonil ein Phenylpyrrol (Gehmann *et al.*, 1990). Als Ursache seiner Wirkung wird sowohl die Hemmung der Atmungskette als auch die Induktion der osmotischen Stressabwehr diskutiert (Okada *et al.*, 2005). Zudem wurde für Ambruticin VS-3 und Jerangolid A eine Kreuzresistenz zu Pyrrolnitrin nachgewiesen (Gerth *et al.*, 1996).

Für die Untersuchungen wurden neben den *C. albicans*-Stämmen 1386 und CAF2-1 Deletionsmutanten verwendet (Kap. 1.3.2), die für Proteine aus dem HOG-Signalweg kodieren. Mit Hilfe der Mutanten ist es möglich, die Signalweitergabe innerhalb dieses Signalweges näher zu betrachten und die Gene zu ermitteln, die essentiell für die Wirkung der Substanzen sind.

4.1.2.1. Wildstämme: 1386 und CAF2-1

Zur Überprüfung des Versuchsansatzes wurden Myxothiazol zur Hemmung der Atmungskette (Bourges *et al.*, 2005) und Sorbitol zur Induktion von osmotischem Stress eingesetzt. Der Einsatz von Myxothiazol führte zu keiner Wachstumsreduktion bei *C. albicans* 1386, unterdrückte aber den Sauerstoffverbrauch deutlich (Abb. 20) und stimulierte die Ethanolproduktion (Abb. 17; Wesolowski *et al.*, 2008). Nach mehr als drei Stunden stieg auch die Glycerinkonzentration signifikant an (Abb. 15). Damit konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Inhibierung der Atmungskette Hefen den Stoffwechsel auf fermentative Wege umschalten und Glycerinkonzentrationen auch als Nebenprodukt dieser Prozesse ansteigen.

Auch bei den mit Sorbitol-behandelten Hefen wurde ein Anstieg an Glycerin im Medium beobachtet (Abb. 15). Dagegen gab es keine Erhöhung der Ethanolkonzentration (Abb. 17).

Damit konnte gezeigt werden, dass die drei metabolischen Indikatoren Glycerin, Ethanol und gelöster Sauerstoff geeignet sind, Inhibitoren der Atmungskette von Aktivatoren

osmotischer Stress-Abwehrreaktionen zu unterscheiden. Inhibitoren der Atmungskette führten bei allen drei Metaboliten zu erhöhten Werten, während die Aktivierung der Abwehrreaktionen von osmotischem Stress nur zu erhöhten Glycerinkonzentrationen führte. Dieser Versuchsansatz wurde nun auf die anderen Substanzen übertragen.

Bei *C. albicans* 1386 stieg nach der Zugabe von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil der Gehalt an Glycerin signifikant an (Abb. 15). Dies war weder von signifikant erhöhten Ethanolkonzentrationen (Abb. 17) noch einem reduzierten Sauerstoffverbrauch begleitet (Abb. 19). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Wirkung der Substanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil auf die Stimulation der Glycerinproduktion beschränkte. Daraus lässt sich schließen, dass die Glycerinproduktion durch die Substanzen über den osmotischen Stressweg vermittelt wird und nicht aus fermentativen Prozessen resultiert.

Für Pyrrolnitrin wurden drei verschiedene Konzentrationen gewählt, da Untersuchungen von Okada *et al.* (2005) bei *N. crassa* darauf hinwiesen, dass geringe Konzentrationen von Pyrrolnitrin den osmotischen Stresssignalweg induzieren, wohingegen hohe Konzentrationen Auswirkungen auf die Atmungskette zeigen. Die Behandlung mit Pyrrolnitrin bei *C. albicans* 1386 zeigte, dass die hohe Konzentration (20 µg/mL) im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen (10 µg/mL, 5 µg/mL) zu einer weitaus geringeren Glycerinerhöhung führte (Abb. 15). Hingegen wies die Ethanolkonzentration sowohl bei der Konzentration von 20 µg/mL als auch bei 10 µg/mL einen signifikanten Anstieg auf (Abb. 17). Die Konzentration von 5 µg/mL führte dagegen zu keinem Unterschied zur Kontrolle (Abb. 17). Bei der Konzentration von 20 µg/mL wurde zwar eine Erhöhung des Sauerstoffgehalts, und damit eine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs beobachtet, was zusammen mit den erhöhten Ethanolkonzentrationen auf eine Inhibierung der Atmungskette hindeutet. Dies korrelierte mit einer Wachstumsreduktion und könnte damit prinzipiell auch andere Ursachen haben (Abb. 19). Damit scheint Pyrrolnitrin tatsächlich bei Konzentration unter 10 µg/mL mit dem osmotischen Stresssignalweg zu interagieren, und bei höheren Konzentrationen möglicherweise auch die Atmungskette zu beeinflussen.

Für den vom Stamm CAF2-1 (*URA3*-heterozygot) abgeleiteten Stamm CAI-4 (Δ *ura3*) war bereits eine Erhöhung der Glycerinproduktion durch Zugabe von Fludioxonil beobachtet worden (Ochiai *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass obwohl bei CAF2-1 keine Auswirkung auf das Wachstum unter Zugabe der Substanzen Ambruticin VS-3 und Jerangolid A beobachtet wurde, die Glycerinproduktion durch alle drei Testsubstanzen signifikant induziert wurde (Abb. 16). Allerdings waren die

Konzentrationen niedriger als beim Stamm 1386. Solch ein unterschiedliches Verhalten von verschiedenen Isolaten von *C. albicans* zeigte bereits Hu *et al.* (2006). Da Glycerin aus Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, gebildet wird, führt eine deutlich erhöhte Glycerinbildung möglicherweise zu einer Verarmung an anderen Produkten der Glykolyse, die damit für die Energiegewinnung nicht mehr zur Verfügung stehen, so dass daraus die Reduktion des Wachstums bei solchen Stämmen resultiert. Auf die Ethanolkonzentration hatten Ambruticin VS-3 und Jerangolid A bei CAF2-1 keinen Einfluss. Daher kann bei CAF2-1 ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die Induktion der Glycerinbiosynthese durch beide Substanzen über den osmotischen Stressweg stimuliert wurde. Im Gegensatz zum Stamm 1386 bewirkte Fludioxonil bei CAF2-1 eine signifikante Ethanolерhöhung. Die Tatsache, dass Fludioxonil bei CAF2-1 zu einer erhöhten Glycerin-, aber auch zu einer erhöhten Ethanolkonzentration führte, schließt eine Wirkung von Fludioxonil auf die Atmungskette nicht aus und könnte bedeuten, dass Fludioxonil wie Pyrrolnitrin mehr als einen Signalweg beeinflusst. Um weitere Aussagen treffen zu können, wären weiterführende Untersuchungen notwendig, z. B. eine Überprüfung des Sauerstoffsverbrauchs bei der Behandlung mit Fludioxonil.

Die Konzentrationen von Glycerin, Ethanol und gelöstem Sauerstoff erwiesen sich nicht nur als geeignet, Wirkmechanismen von Substanzen voneinander zu unterscheiden, sondern, im Vergleich zu Wachstumshemmtests, auch als sensitivere Indikatoren für die Wirkung der Testsubstanzen (Wesolowski *et al.*, 2009). Daher wurden Glycerin- und Ethanolkonzentrationen auch für die Deletionsmutanten bestimmt.

4.1.2.2. *C. albicans*-Histidinkinase-Mutanten: $\Delta sln1$, $\Delta chk1$ und $\Delta cos1$

C. albicans besitzt drei Histidinkinasen: Sln1, Chk1 und Cos1. Die membranständige Histidinkinase Sln1 gilt als Sensor für osmotische Veränderungen und wird funktional dem HOG-Signalweg zugeordnet. Unter normalen Bedingungen ist Sln1 durch Autophosphorylierung aktiv und der MAPK-Signalweg inaktiv (Kap. 1.3.2). In Folge von osmotischem Stress wird die Autophosphorylierung unterbunden und der MAPK-Signalweg wird aktiviert. Eine *SLN1*-Deletion in *S. cerevisiae* ist nicht möglich (Maeda *et al.*, 1994), allerdings ist *C. albicans* ohne Sln1 lebensfähig (Nagahashi *et al.*, 1998).

Cos1 ist eine Histidinkinase Typ III, und das homologe Protein zu Hik1 aus *M. grisea* und AbNik1 aus *A. brassicicola*, für die eine Beteiligung an der Wirkung von Ambruticin VS-3 und Fludioxonil gezeigt wurde (Motoyama *et al.*, 2005a; Vetcher *et al.*, 2007; Dongo *et al.*, 2009). Die genaue Funktion von Cos1 ist bislang noch unklar. In anderen Pilzen ist diese

Histidinkinase ebenfalls in den HOG-Signalweg involviert. Da eine Doppeldeletion von Cos1 und Sln1 nicht möglich ist (Yamada-Okabe *et al.*, 1999), könnten beide Proteine in *C. albicans* eine parallele Stellung in diesem Weg haben.

Die dritte Histidinkinase Chk1 ist wie Cos1 ein cytosolisches Protein, welches nicht zur Autophosphorylierung befähigt ist. Chk1 befindet sich nicht im gleichen Signalweg wie die beiden anderen Histidinkinasen, da die jeweiligen Doppeldeletionen möglich sind. Chk1 spielt eine Rolle beim Quorum Sensing, bei der Zellwandbiosynthese (Kruppa *et al.*, 2004) sowie bei der Abwehr von oxidativem Stress (Li *et al.*, 2004).

Von den drei Histidinkinase-Mutanten führte die Behandlung mit den Testsubstanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil bei der $\Delta cos1$ -Mutante zu einem Verlust des Signals, das heißt, die Glycerinproduktion unterschied sich nicht von der Lösungsmittelkontrolle und deutet somit eine Beteiligung am HOG-Signalweg an (Abb. 16). Prinzipiell konnte bei der $\Delta cos1$ -Mutante keine signifikante Veränderung der Ethanolkonzentration gezeigt werden, allerdings unterlagen die Ergebnisse der Experimente starken Schwankungen, was eine Interpretation der Daten erschwert. Bei $\Delta sln1$ wurde eine signifikante Glycerinproduktion nach allen Substanzbehandlungen festgestellt (Abb. 16) und $\Delta chk1$ zeigte ein ähnliches Verhalten wie der Referenzstamm CAF2-1 sowohl beim Glycerin- als auch beim Ethanolgehalt. Bei der $\Delta sln1$ -Mutante wurde keine signifikante Erhöhung der Ethanolkonzentration beobachtet (Abb. 18). Es zeigte sich sogar, dass fünf Stunden nach Zugabe von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A zu $\Delta sln1$ der Ethanolgehalt signifikant erniedrigt war. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass durch die hohe Glycerinproduktion nicht ausreichend NADH zur Ethanolproduktion zur Verfügung stand.

Damit kommt unter den Histidinkinasen nur Cos1 als Target für die Testsubstanzen in Frage, da nur diese Deletion zur Resistenz der Mutante führte. Diese Vermutung wird gestützt durch die Arbeit von Gremmer (2008), wo durch die Transformation von *S. cerevisiae* mit Cos1 die Sensitivität für die Testsubstanzen transferiert wurde. Wie bereits erwähnt, ist noch nicht genau bekannt, wie die Signaltransduktionskaskaden aufgebaut sind, welche die Funktionen der Histidinkinasen, insbesondere von Cos1, vermitteln. Eine Beteiligung von Cos1 am HOG-Signalweg in *C. albicans* wird angenommen, wurde aber bislang noch nicht gezeigt. Aus diesem Grund wurden vor allem Deletionsmutanten von Genen, die dem HOG-Weg zugeordnet werden, untersucht.

4.1.2.3. *C. albicans*-Deletionsmutanten: $\Delta ssk1$, $\Delta pbs2$, $\Delta hog1$ und $\Delta gpp1$

Der Antwortregulator Ssk1 stellt in *S. cerevisiae* das Schlüsselement der In-/Aktivierung des HOG-Signalweges dar (Kap. 1.3.2). Unter normalen Bedingungen liegt Ssk1 durch die Aktivität der Histidinkinase Sln1 phosphoryliert vor. Unter osmotischem Stress ist Sln1 inaktiv und damit bleibt die Phosphorylierung von Ssk1 aus. Dadurch ist eine aktivierende Wechselwirkung mit der MAPKKK Ssk2 möglich, die dann die MAPKK Pbs2 phosphoryliert und diese die MAPK Hog1. Phosphoryliertes Hog1 induziert die Expression von Genen, das zu einer Stimulation der Glycerinbiosynthese führt. Der finale Schritt der Glycerinbiosynthese ist die Dephosphorylierung des Glycerin-3-Phosphates durch die Glycerin-3-Phosphatase (*GPPI*), deren Expression über die MAPK Hog1 reguliert wird.

Für *C. albicans* ist nicht eindeutig, durch welche der Histidinkinasen der Antwortregulator Ssk1 aktiviert wird. Daher sollte mit den Deletionsmutanten geklärt werden, ob für die Induktion der Glycerinproduktion und damit für die Wirkung der Testsubstanzen tatsächlich der HOG-Signalweg essentiell ist und ob Cos1 zu ihm in funktioneller Beziehung steht. In anderen Pilzen, wie *N. crassa* (Noguchi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002; Dongo *et al.*, 2009), wurde diese Verbindung zwar nachgewiesen, konnte aber zum Beispiel bei *Botrytis cinerea* nicht bestätigt werden (Liu *et al.*, 2008).

Bei den Deletionsmutanten $\Delta ssk1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta hog1$ führte die Behandlung mit Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil im Gegensatz zum Referenzstamm CAF2-1 zu keiner Erhöhung der Glycerinproduktion (Abb. 16). Auch bei der $\Delta gpp1$ -Mutante wurde keine erhöhte und insgesamt geringe Glycerinkonzentration festgestellt. Die Ethanolkonzentration zeigte bei $\Delta ssk1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta gpp1$ keine signifikanten Veränderungen, allerdings unterlagen die Ergebnisse der Mutanten $\Delta ssk1$ und $\Delta pbs2$ starken Schwankungen, was eine eindeutige Interpretation der Daten erschwerte (Abb. 18). Die $\Delta hog1$ -Mutante zeigte ein ähnliches Verhalten in der Ethanolkonzentration wie der Referenzstamm CAF2-1 (Abb. 18). Der grundsätzlich geringe Glyceringehalt der Mutanten $\Delta ssk1$, $\Delta pbs2$ und $\Delta hog1$ könnte mit einer abgeschwächten Expression der Glycerin-3-Phosphatase (*GPPI*) erklärt werden, wie sie für die $\Delta hog1$ -Mutante beschrieben wurde (Kayingo & Wong, 2005).

Damit konnte gezeigt werden, dass ohne die Komponenten Ssk1, Pbs2 und Hog1 keine Erhöhung einer Glycerinproduktion durch die Substanzen stattfindet und die Deletion dieser Gene zu einer Unempfindlichkeit gegenüber den Substanzen führt. Daraus lässt sich schließen, dass in *C. albicans* die Substanzwirkung über den Antwortregulator Ssk1 und

den HOG-Signalweg mit den Komponenten Pbs2 und Hog1 vermittelt wird. Diese Ergebnisse werden durch Studien gestützt, die zeigten, dass obwohl Ssk1 von *C. albicans* eine Deletion von Ssk1 in *S. cerevisiae* nicht ersetzen kann (Calera & Calderone, 1999), sich Ssk1 auch in den transformierten Stämmen von *S. cerevisiae* für die Wirkung der Fungizide essentiell erweist (Motoyama *et al.*, 2005b), und auch die Ambruticin-Wirkung in *N. crassa* vermittelt (Dongo *et al.*, 2009).

Auch wenn alle drei Testsubstanzen im Prinzip auf ähnliche Signalkaskaden zu wirken scheinen, ist ihre Wirkung im Detail doch unterschiedlich. Insbesondere bei Fludioxonil wurden durch die erhöhten Ethanolkonzentrationen auch Hinweise auf andere Wirkungen deutlich.

4.1.2.4. *C. albicans*-Deletionsmutante: $\Delta sit4$

Die Proteinphosphatase Sit4 wurde erstmals in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* identifiziert (Arndt *et al.*, 1989). *SIT4* kodiert eine katalytische Untereinheit einer Typ 2A-verwandten Proteinphosphatase (Lee *et al.*, 2004) und ist in verschiedenen Prozesse involviert, wie die durch die TOR-Proteinkinase (engl. *target of rapamycin*) vermittelten Signaltransduktionsprozesse (Cardenas *et al.*, 1999; Schmelzle & Hall, 2000; Valenzuela *et al.*, 2001), die Pseudohyphenbildung (Cutler *et al.*, 2001) sowie Hefe-Hyphen-Morphologiewechsel (Lee *et al.*, 2004). Möglicherweise ist Sit4 auch bei der Abwehr von osmotischem Stress beteiligt, da $\Delta sit4$ -Zellen ein reduziertes Transkriptionslevel an Genen besitzen, die für die MAPK Hog1 sowie einige Regulatoren der Proteinsynthese kodieren (Lee *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Verbindung zu Hog1 wurde die $\Delta sit4$ -Mutante in die Untersuchung mit aufgenommen.

Die Testsubstanzen führten bei der $\Delta sit4$ -Mutante zu einer Reduktion des Wachstums (Tab. 8, Abb. 11, Abb. 13). Prinzipiell verhielt sich die $\Delta sit4$ -Mutante dem Referenzstamm CAF2-1 sehr ähnlich, d. h. die Zugaben von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil führten zu einer Erhöhung der extrazellulären Glycerinkonzentrationen (Abb. 16) und die Ethanolproduktion wurde nicht beeinflusst (Abb. 18). Das heißt, dass Sit4 nicht unmittelbar in den HOG-Signalweg involviert ist.

4.1.3. Phosphorylierung der MAPK Hog1 durch Ambruticin VS-3 und Fludioxonil

Bislang konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Substanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil zu einer Erhöhung der Glycerinkonzentration führten und lieferten den Hinweis eines aktiven HOG-Signalweges. Seine Aktivierung führt zur

Phosphorylierung der MAPK Hog1, die nach Phosphorylierung im Zellkern die Transkription verschiedener Gene reguliert (Kap. 1.3.2). Damit ist phosphoryliertes Hog1 der erste Indikator für einen aktiven HOG-Signalweg. Bereits vorangegangene Studien berichteten, dass die Wirkung von Ambruticin VS-3 und Fludioxonil auf die Histidinkinasen Typ III an eine Phosphorylierung von Hog1 gekoppelt ist. So führte die Expression von *HIK1* aus *M. grisea* in *S. cerevisiae* nicht nur zur Sensitivität gegenüber Ambruticin VS-3 und Fludioxonil sondern auch zur Phosphorylierung von Hog1 (Motoyama *et al.*, 2005b; Vetcher *et al.*, 2007). In *N. crassa* war Os2 (Homolog von Hog1) nach Fludioxonil-Behandlung phosphoryliert (Noguchi *et al.*, 2007) und ein Vertreter von Pflanzenpathogenen, *A. brassicicola*, wiederum zeigte eine Hog1-Phosphorylierung nach Exposition mit Fludioxonil und Ambruticin VS-4 (Dongo *et al.*, 2009).

Um zu überprüfen, ob Ambruticin VS-3 und Fludioxonil in *C. albicans* ebenfalls zu einer Phosphorylierung der MAPK Hog1 führen, wurden Proteinanalysen mittels Western-Blot durchgeführt (Kap. 2.2.7). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl in *C. albicans* CAF2-1 als auch im Stamm 1386 nach Zugabe von Ambruticin VS-3 und Fludioxonil Hog1 phosphoryliert wurde (Abb. 21). Daraus lässt sich schließen, dass auch in *C. albicans* der HOG-Signalweg aktiviert wurde.

Gremmer (2008) zeigte durch Transformation der Histidinkinase *COS1* aus *C. albicans* in *S. cerevisiae*, dass Hog1 bei Behandlung mit Fludioxonil phosphoryliert wird. Daher wurde die $\Delta cos1$ -Mutante mit Ambruticin VS-3 und Fludioxonil inkubiert, und es wurde keine Erhöhung von phosphoryliertem Hog1 gegenüber der Kontrolle beobachtet (Abb. 21). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei Cos1 um das vermutete Target der Substanzen handelt.

4.1.4. Einfluss von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A auf die Genexpression

Im Vorfeld wurde für *C. albicans* 1386 sowie CAF2-1 bereits gezeigt, dass der HOG-Signalweg durch die Behandlung aktiviert und die damit verbundene Glycerinbiosynthese induziert wurde (Kap. 4.1.2, 4.1.3). Ergänzend dazu wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Genexpressionsprofil von *C. albicans* nach Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A näher untersucht. Anhand einer veränderten Genexpression durch die Behandlung lassen sich Rückschlüsse auf die Notwendigkeit von Proteinen in der Zelle schließen und können Hinweise auf betroffene Signalwege liefern.

4.1.4.1. Veränderung der Expression von stressassoziierten Genen in *C. albicans* durch die Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A

Zunächst wurde der Einfluss der Substanzen Ambruticin VS-3 und Jerangolid A auf die Expression von 70 ausgewählten Genen in den Wildstämmen 1386 und CAF2-1 sowie den Mutanten $\Delta cos1$ und $\Delta sit4$ analysiert. Es wurden solche Gene ausgewählt, die nach Literaturangaben mit der Abwehr von osmotischem und oxidativem Stress in *C. albicans* oder *S. cerevisiae* in Verbindung stehen (Kap. 6.2).

Der Stamm 1386 hatte bereits bei den vorherigen Untersuchungen eine hohe Sensitivität gegenüber Ambruticin VS-3 und Jerangolid A gezeigt, und wies auch im Transkriptionsprofil die deutlichsten Veränderungen auf. So wurde die Expression von 43 (der 70 ausgewählten) Genen durch die Anwesenheit von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A im Vergleich zu Lösungsmittelkontrolle Methanol signifikant ($p < 0.05$) reguliert. Dabei wurden die Gene bis auf wenige Ausnahmen hochreguliert.

Zu den untersuchten Genen gehörten die Gene aus dem HOG-Signalweg. Dazu zählten die der Histidinkinasen *SLN1* und *COS1*, des Antwortregulators *SSK1*, aber auch die aus der MAPK-Kaskade *SSK2*, *PBS2* und *HOG1* (Abb. 7). All diese Komponenten zeigten in deren Genen bei der Behandlung mit Ambruticin VS-3 eine hochregulierte Transkription (Tab. 9). Auch die Jerangolid A-Behandlung zeigte eine Hochregulierung der HOG-Signalweg assoziierten Gene, allerdings waren die Signalintensitäten im Vergleich zur Behandlung mit Ambruticin VS-3 geringer (Tab. 9). Das kann damit erklärt werden, dass bereits in den vorangegangenen Untersuchungen die Hefen auf Ambruticin VS-3 sensibler reagierten als auf Jerangolid A. So waren die Hemmhöfe bei den Hefen und größtenteils auch bei den filamentösen Pilzen im Agar-Diffusionstest bei Ambruticin VS-3 größer als

bei Jerangolid A (Tab. 8). Zudem zeigten sich in der Glycerinanalyse bei Ambruticin VS-3 höhere Anstiege im Vergleich zu Jerangolid A (Abb. 15).

Daraus lässt sich schließen, dass beim Stamm 1386 aufgrund der induzierten Expression der Gene des HOG-Signalweges, ein erhöhter Bedarf an diesen Proteinen besteht. Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass dieser Signalweg durch Ambruticin VS-3 und Jerangolid A beeinflusst wird.

Des Weiteren zeigten Gene aus der Glycerinbiosynthese wie *GPD2* und *GPPI*, auch als *RHR2* bezeichnet (Abb. 9), die unter anderem auch zu den allgemeinen Stressgenen zählen (Enjalbert *et al.*, 2006), eine hochregulierte Transkription nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A. Weitere hochregulierte Gene aus dem Glycerinmetabolismus waren *GPD1*, *IPF1764*, auch *GUP1* genannt, und *GUT1* (Abb. 9). Ergänzend dazu ist zu erwähnen, dass *GUT1* für ein Protein kodiert, das an der Glycerindegradation beteiligt ist. Ein Abbau von Glycerin führt zum Zwischenprodukt der Glykolyse, dem Dihydroxyacetonphosphat, das dann wieder für die Energiegewinnung verfügbar wäre. Die Hochregulation dieser am Glycerinmetabolismus beteiligten Gene deutet auf eine erhöhte Aktivität der Glycerinbiosynthese hin. Diese Daten werden gestützt durch die vorherigen Ergebnisse, wo gezeigt wurde, dass die Substanzbehandlung zu einer Erhöhung des Glyceringehaltes führte (Kap. 4.1.2.1).

Neben den Genen der Hog1-Kaskade wurden auch Gene von Komponenten der MAPK-Kaskaden aus dem Mkc1- und Cek1-Signalweg, stärker exprimiert, die für die Zellwandintegrität von Bedeutung sind und ebenfalls bei oxidativem und osmotischem Stress aktiviert werden (Navarro-Garcia *et al.*, 2005; Monge *et al.*, 2006). Dazu gehören die Gene *SHO1* (Sensor), *STE11* (MAPKKK), *HST7* (MAPKK), *CEK1* (MAPK) und *MKC1* (MAPK) (Abb. 8). Die Hochregulation des Transkriptionsfaktors *CPH1*, dessen Regulation der MAPK Cek1 unterliegt (Csank *et al.*, 1998), deutet auf einen aktiven Cek1-Signalweg hin. Um zu klären, ob die beiden MAPK-Signalwege durch die Substanzbehandlungen beeinflusst werden, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Dabei wären ergänzende Proteinanalysen der MAPK Mkc1 und Cek1 hilfreich, wodurch, wie bei der MAPK Hog1, Aussagen über die Aktivität dieser Proteine getroffen werden können. Auch der Antwortregulator *SKN7* zeigte eine hochregulierte Transkription bei den Behandlungen, obwohl Untersuchungen zeigten, dass eine Adaption an oxidativen Stress für eine Aktivierung von Hog1 nicht nötig ist (Charizanis *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2004). Die hochregulierte Transkription von Genen, die im Energie-Stoffwechsel involviert sind, deutet auf eine hohe Stoffwechselaktivität in den Hefen hin. Das würde auch erklären,

warum der Glyceringehalt nach den Behandlungen der Hefen des Stammes 1386 mit den Testsubstanzen weitaus höher war als bei CAF2-1 oder der $\Delta sit4$ -Mutante (Kap. 3.2.1).

Weitere stressassoziierte Gene aus metabolischen Prozessen und des filamentösen Wachstums wurden durch die Behandlungen im Stamm 1386 signifikant hochreguliert (Tab. 11). Dazu gehören *CTA1*, kodierend für Katalase A und zugeordnet zu den allgemeinen Stressgenen (Enjalbert *et al.*, 2006) sowie *STL1*, das bei osmotischen Stress verstärkt exprimiert wird und aktiv am Glycerintransport in die Hefenzellen beteiligt ist (Kayingo *et al.*, 2009). Interessanterweise wurden Gene aus dem Bereich des filamentösen Wachstums ebenfalls hochreguliert. Dazu gehörte *CLA4*, kodierend für eine Serin/Threonin-Kinase aus der Familie Ste20-Proteine, die als Transduktionselement in Morphogenese und Virulenz involviert ist (Leberer *et al.*, 1997; Phan *et al.*, 2000), aber auch *TUP1*, der als allgemeiner Transkriptionsrepressor das filamentöse Wachstum unterdrückt. Um herauszufinden, ob Ambruticin VS-3 und Jerangolid A das filamentöse Wachstum in *C. albicans* beeinflussen, könnten mikroskopische Untersuchungen und der Einsatz von Hyphen-induzierenden Stimulanzen als Vergleichsbehandlung zu genaueren Aussagen beitragen.

Im Gegensatz zum Stamm 1386 zeigte CAF2-1 eine durch die Behandlungen wenig veränderte Genexpression. Von den 70 Genen wurden nach den Behandlungen sieben Gene mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ reguliert. Wie auch beim Stamm 1386 wurden die Gene *SLN1*, *MKC1*, *TUP1* und *PPZ1* hochreguliert sowie das Glycerinbiosynthesegen *GPD2*. Allerdings zeigten auch *SOD1.3* (kodierend für eine Superoxid-Dismutase) und *SAT2* (kodierend für eine Glykosyltransferase) eine hochregulierte Transkription, die beim Stamm 1386 nicht auftrat. Gründe, warum bei CAF2-1 weniger Gene reguliert und beispielsweise *HOG1* in CAF2-1 nicht mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ reguliert wurde, könnten in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen beider Wildstämme liegen. Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Ambruticin wurden bereits bei mehreren *C. albicans*-Stämmen gefunden (Shadomy *et al.*, 1978) und zeigten sich auch in dieser Arbeit bei den Wachstumsanalysen (Tab. 8, Abb. 13). Hinzu kommt der Anstieg von Glycerin, der bei CAF2-1 weitaus geringer war als beim Stamm 1386 (Abb. 15, Abb. 16). Aber es konnte eine Aktivierung des HOG-Signalweges in CAF2-1 durch die Substanzbehandlung mit Hilfe der Proteinanalyse gezeigt werden (Abb. 21) und nach Literaturangaben ist die Induktion der Genexpression von *GPD2* unter osmotischen Bedingungen Hog1-abhängig (Cheetham *et al.*, 2007). Das lässt vermuten, dass durch die Substanzbehandlung im Stamm CAF2-1 der HOG-Signalweg aktiviert wird.

Die $\Delta sit4$ -Mutante reagierte auf die Substanzbehandlung mit einer signifikanten Regulation von 10 Genen. Zu den hochregulierten Genen zählten *SSK1* (Antwortregulator, Tab. 9), die Glycerinbiosynthesegene *GPD2* und *GPP1/RHR2* (Tab. 10) sowie fünf weitere Gene aus dem Metabolismus (*SGD1.3f*, *MLS1*, *OSM2*, *YHB2*, Tab. 11). Das Gen *TUB1.3* wurde in $\Delta sit4$ bei der Ambruticin VS-3- und Jerangolid A-Behandlung herunterreguliert. Von den sieben erwähnten hochregulierten Genen war die einzige Übereinstimmung zum Stamm CAF2-1 das Gen *GPD2*. Interessanterweise wurde bei der $\Delta sit4$ -Mutante nach Exposition mit Ambruticin VS-3 die Transkription von *GUT1* und *GUT2* hochreguliert, wohingegen diese Gene nach Jerangolid A-Behandlung herunterreguliert wurden. Um dieses Ergebnis der Genexpressionsanalyse zu verifizieren, könnte Dihydroxyaceton, ein Abbauprodukt von Glycerin, bestimmt werden. Damit könnte überprüft werden, ob in den Jerangolid A-behandelten Hefen der Glycerinabbau tatsächlich reduziert wird. Zudem könnte gezeigt werden, dass sich die Wirkung von Ambruticin VS-3 und Jerangolid A zwar ähnelt, aber nicht gleich ist.

Die $\Delta cos1$ -Mutante, der das vermutete Target der Testsubstanzen fehlt, zeigte bei keiner der Behandlungen im Vergleich zur Methanolkontrolle eine signifikante Veränderung der Transkription. Bereits im Vorfeld zeigten die Untersuchungen, dass die Testsubstanzen die $\Delta cos1$ -Mutante weder im Wachstum noch in der Glycerinproduktion beeinflussten (Kap. 3.1.3, 3.2.1) und die Phosphorylierung der MAPK Hog1 nach Substanzbehandlung unverändert blieb (Kap. 3.3). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Cos1 das Target der Testsubstanzen Ambruticin VS-3 und Jerangolid A ist.

Zusammenfassend kann zu den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse gesagt werden, dass nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 und Jerangolid A in den Stämmen 1386, CAF2-1 und der $\Delta sit4$ -Mutante Gene aus dem HOG-Signalweg hochreguliert wurden. Somit konnte gezeigt, dass ein erhöhter Bedarf der jeweiligen Proteine in der Zelle besteht. Zudem wurde das Gen *GPD2*, kodierend für ein Enzym der Glycerinbiosynthese, hochreguliert. Da bekannt ist, dass ein aktivierter HOG-Signalweg zu einer Erhöhung der Transkription von *GPD2* führt (Cheetham *et al.*, 2007), lieferten die Daten der Genexpression einen weiteren Hinweis auf die Wirkung der Substanzen auf den HOG-Signalweg. Dies stützt die Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass die Substanzbehandlung bei diesen Stämmen zu einer erhöhten Glycerinproduktion führte (Kap. 4.1.2), und dass die MAPK Hog1 durch die Behandlung aktiviert wurde (Kap. 4.1.3).

Des Weiteren zeigten die vorherigen Untersuchungen, dass die ΔcosI -Mutante gegenüber den Substanzen resistent ist, da weder die Glycerinbiosynthese noch der HOG-Signalweg aktiviert wurde. Das lässt vermuten, dass die Histidinkinase Cos1 das Target der Substanzen ist. Diese Vermutung konnte durch die Genexpressionsanalyse weiter bestätigt werden, da die ΔcosI -Mutante keine Veränderungen nach der Substanzbehandlung aufwies.

Neben den Genen aus dem HOG-Signalweg wurden auch Komponenten aus anderen Signalkaskaden nach der Substanzbehandlung signifikant hochreguliert. Dazu zählten Gene aus dem Cek1- und Mkc1-Signalweg. Um die Bedeutung der Signalkaskaden weiter zu untersuchen, wurde die Genexpressionsanalyse auf das gesamte Genom erweitert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.1.4.2. Transkriptomanalyse-weitere Hinweise auf betroffene Signalkaskaden in *C. albicans* durch Ambruticin VS-3

Die Behandlung der Hefen mit Ambruticin VS-3 löst die Aktivierung des HOG-Signalweges aus (Kap. 4.1.3), der die Glycerinbiosynthese induziert (Kap. 4.1.2). Diese Aussage wurde durch die Genexpressionsanalyse von stressassoziierten Genen gestützt (Kap. 4.1.4.1). Da die ΔcosI -Mutante bei keiner der Untersuchungen auf die Testsubstanz reagierte, lässt sich daraus schließen, dass es sich bei Cos1 um das Target der Testsubstanzen handelt. Ein Zusammenhang von Cos1 mit dem HOG-Signalweg konnte gezeigt werden, es sind aber andere Funktionen dieser Histidinkinase nicht ausgeschlossen. So wurde berichtet, dass Cos1 eine Bedeutung für das Hyphenwachstum hat (Alex *et al.*, 1998). Die vorangegangene Genexpressionsanalyse konnte zeigen, dass Gene, kodierend für Proteine aus den Cek1- und Mkc1-Signalweg, nach der Substanzbehandlung verstärkt exprimiert wurden (Kap. 4.1.4.1). Beide Prozesse sind beteiligt an dem Hyphenwachstum und der Zellwandbiosynthese (Navarro-Garcia *et al.*, 1995; Csank *et al.*, 1998). Um die Wirkung von Ambruticin VS-3 eingehender zu prüfen, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, welche die Untersuchung des gesamten Genoms ermöglichten.

Dabei kamen die Stämme 1386, CAF2-1, ΔcosI und Δsln1 zum Einsatz. Probleme bei der Bearbeitung der DNA-Chips führten zu sehr geringen Signalintensitäten, so dass nur eine eingeschränkte Auswertung möglich war, da viele Spots den Qualitätsansprüchen an signifikante Signale (ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis bzw. Spot-Hintergrund-Verhältnis) nicht genügten und daher nicht weiter berücksichtigt werden konnten.

Der Stamm 1386 zeigte wie zuvor die größte Veränderung in der Transkription. Von den rund 6000 Genen wurde die Expression von 198 Genen im Vergleich zu Methanol reguliert. Von den 198 Genen konnten 170 Gene metabolischen Prozessen, z. B. RNA-Synthese, Ribosomenbiosynthese, Zellzyklus und Transport zugeordnet werden. Dies wurde in Bezug auf die zugrunde liegende Thematik als nicht relevant betrachtet. Die restlichen 28 Gene konnten den Prozessen Stressantwort, Signaltransduktion, Hyphenwachstum und Zellwandbiosynthese zugeordnet werden (Tab. 12). Größenteils wurden Gene hochreguliert, die in die Stressantwort involviert sind. Dazu gehörten *HSP12*, das den allgemeinen Stressgenen in *C. albicans* zugeordnet wird (Enjalbert *et al.*, 2006) und *GCY1*, das auch in Untersuchungen von *N. crassa* nach Fludioxonil-Behandlung verstärkt exprimiert wurde (Noguchi *et al.*, 2007). Es konnten bei diesen Untersuchungen keine Effekte auf Gene, kodierend für Proteine aus dem HOG-Signalweg, nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte in der oben erwähnten Problematik der Chip-Bearbeitung liegen. Daher wäre es möglich, dass auch relevante Gene aufgrund zu geringer Signalintensitäten eliminiert wurden. Dennoch konnte das Gen *CEK1* der MAPK in der Auswertung wiederholt als signifikant reguliert detektiert werden, ebenso wie die Gene *GPPI1/RHR2* und *GPD2* der Glycerinbiosynthese (Vergleich Kap. 3.4.1). Zudem wurde *DDR48* hochreguliert, das nach Literaturangaben durch den Transkriptionsfaktor Cph1 aus dem Cek1-Signalweg reguliert wird (Lane *et al.*, 2001). Hinzu kommt, dass das Gen *BCK1*, das für die der MAPK Mkc1 vorgeschaltete MAPKKK Bck1 kodiert, signifikant hochreguliert wurde. Ob der Cek1- und Mkc1-Signalweg tatsächlich durch Ambruticin VS-3 aktiviert werden, müsste durch weiterführende Untersuchungen eingehender überprüft werden (Kap. 4.3).

Interessanterweise wurden beim Stamm 1386 Gene reduziert exprimiert, die im Hyphenwachstum involviert sind (Kap. 3.4.2). Beispielsweise wurde *HAC1* beim Stamm 1386 herunterreguliert, ein Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der bei der Stressantwort sowie bei der Regulation der Morphologie von Bedeutung ist (Wimalasena *et al.*, 2008). Das lässt vermuten, dass die Testsubstanz eine reprimierende Wirkung auf die Bildung von Hyphen hat. Eine Inhibierung des Hyphenwachstums bei *C. albicans* konnte bereits für Fludioxonil gezeigt werden (Ochiai *et al.*, 2002).

Die erhöhte Transkription von Genen aus der Zellwandbiosynthese lieferte einen Hinweis darauf, dass Ambruticin VS-3 möglicherweise die Zellwandbiosynthese in *C. albicans* beeinflussen könnte. Das müsste allerdings noch durch weitere Untersuchungen eingehender geprüft werden.

Im Gegensatz zum Stamm 1386 wurden bei CAF2-1 46 Gene signifikant hochreguliert und zeigten damit ebenfalls eine Veränderung in der Genexpression. Übereinstimmungen mit dem Stamm 1386 zeigte die Hochregulation der Gene *HSP12*, *DDR48* und *GCY1* (Kap. 3.4.2). Ebenfalls wurden bei CAF2-1 Gene, die mit der Zellwandbiosynthese assoziiert sind, nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 hochreguliert. Anders als im Stamm 1386 wurden bei CAF2-1 nach der Ambruticin VS-3-Behandlung mehrere Gene, die mit der Hyphenbildung (*PHR1*, *KEX2*, *LAS17*, *FGR34*) assoziiert sind, hochreguliert. Ob die Hyphenbildung bei CAF2-1 beeinflusst wird und die Zellwandbiosynthese sich durch Ambruticin VS-3 verändert, müsste durch zusätzliche Experimente überprüft werden. Zum einen könnte die Expression einzelner Gene mit Hilfe der realTime-PCR überprüft werden, zum anderen könnte durch mikroskopische Untersuchungen der Einfluss auf die Morphologie in den verschiedenen Stämmen näher charakterisiert werden.

In der Δ *sln1*-Mutante wurden, nach der Behandlung mit der Testsubstanz, 48 Gene reguliert, von denen 39 Gene metabolischen Prozessen zugeordnet werden konnten und neun Gene in die Stressantwort, das Hyphenwachstum oder die Zellwandbiosynthese involviert sind. Die Δ *sln1*-Mutante wies Übereinstimmungen zum Transkriptionsprofil sowohl vom Stamm 1386 als auch von CAF2-1 auf. Beispielsweise wurden wie beim Stamm 1386 die Gene *HAC1*, *BCK1* und *DDR48* hochreguliert, Gene, die mit dem Cek1- und Mkc1-abhängigen Signalweg in Zusammenhang stehen. Im Vergleich zu CAF2-1 gab es eine Übereinstimmung im Gen *REV1*, das bei beiden verstärkt exprimiert wurde. Aber es traten auch Gene auf, die weder beim Stamm 1386 noch bei CAF2-1 signifikant reguliert wurden. Aufgrund der erwähnten Problematik der DNA-Chips wären zunächst weitere Untersuchungen nötig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

In der Δ *cos1*-Mutante wurden 15 Gene als signifikant selektiert, davon waren vier aus einer der erwähnten Kategorien und es fanden sich keine Übereinstimmungen zum Referenzstamm CAF2-1. Ein Grund dafür, dass in der Δ *cos1*-Mutante Gene reguliert wurden aber nicht im Referenzstamm CAF2-1, könnten die Probleme mit der Bearbeitung der DNA-Chips sein. Daher wären weitere Untersuchungen notwendig, um zu überprüfen, ob diese Gene tatsächlich nur in der Δ *cos1*-Mutante reguliert werden. Interessanterweise wurden im Gegensatz zu den anderen untersuchten Stämmen bei der Δ *cos1*-Mutante keine Gene der Zellwandbiosynthese signifikant reguliert. Um Rückschlüsse auf eine Beteiligung der Substanzwirkung auf die Zellwandbiosynthese ziehen zu können, wären auch hier weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese Ergebnisse zu der Δ *cos1*-Mutante zu bestätigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Genexpression des gesamten Genoms von *C. albicans* nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 nur geringfügig verändert wurde. Die Ursache dafür könnte auf die erwähnte Problematik bei der Bearbeitung der DNA-Chips zurückgeführt werden. Daher wurden die ermittelten Signalintensitäten durch einen zusätzlichen Faktor selektiert, um nur die stark hoch-/herrunterregulierten Gene zu erfassen. Das könnte auch der Grund dafür sein, dass Gene, die in den vorherigen Genexpressionsanalysen als signifikant reguliert gewertet wurden, in der Transkriptomanalyse nicht auswertbar waren.

Dennoch lieferten die wenigen als signifikant betrachteten und stark exprimierten Gene einige Hinweise auf möglicherweise betroffene Prozesse, z. B. die Expression der mit der Glycerinbiosynthese assoziierten Gene *GPP1* und *GPD2*, die sowohl in diesen als auch in den vorherigen Untersuchungen nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 in *C. albicans* 1386 hochreguliert wurden. Das lässt vermuten, dass die Behandlung mit Ambruticin VS-3 die Glycerinbiosynthese in *C. albicans* beeinflusst und deutet erneut auf eine Aktivierung des HOG-Signalweges hin (Kap. 4.1.4.1).

In der Literatur wurde angedeutet, dass Cos1, das vermutete Target der Substanz, am Hyphenwachstum und an der Zellwandbiosynthese in *C. albicans* involviert ist (Alex *et al.*, 1998; Kruppa *et al.*, 2004). An diesen Prozessen beteiligte Signalwege sind der Cek1- und Mkc1-abhängige Signalweg (Navarro-Garcia *et al.*, 1995; Csank *et al.*, 1998). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem HOG-Signalweg und diesen beiden Signalkaskaden (Eisman *et al.*, 2006; Navarro-Garcia *et al.*, 2005). Mit der Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass nach der Substanzbehandlung Gene verstärkt reguliert wurden, die für Proteine aus dem Cek1- und Mkc1-abhängigen Signalweg kodieren. Insbesondere das Gen *CEK1*, das für die MAPK aus dem Cek1-Signalweg kodiert, wurde wie zuvor in diesen Untersuchungen nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 bei dem Stamm 1386 hochreguliert. Zudem wurden beim Stamm 1386 Gene des Hyphenwachstums herunterreguliert. Hinzu kommt, dass Gene der Zellwandbiosynthese durch Ambruticin VS-3 hochreguliert wurden. Somit lieferten die Daten der Transkriptomanalyse einen Hinweis darauf, dass Ambruticin VS-3 eine Auswirkung auf die Cek1- und Mkc1-abhängigen Signalkaskade und damit verbunden auf das Hyphenwachstum und die Zellwandbiosynthese haben könnte.

Beide Prozesse spielen eine wichtige Rolle bei der Virulenz des Hefepilzes. Daher wurde Ambruticin VS-3 in einem in-vitro-Infektionsmodell eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Pathogenität von *C. albicans* durch Ambruticin VS-3 beeinflusst wird.

4.2. Einfluss von Ambruticin VS-3 auf die Aufnahme von *C. albicans* durch Immunzellen

Der Mensch verfügt zur Bekämpfung von Krankheitserregern über eine komplexe Immunabwehr, bestehend aus zwei miteinander vernetzten Systemen: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Beide bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten. Dazu zählen verschiedene Typen von Immunzellen sowie immunologisch aktive Proteine. Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr sind die Phagozyten, zu denen Makrophagen gehören. Diese Immunzellen besitzen eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren, welche mit Erreger-assoziierten Strukturen (z. B. Zellwandkomponenten von Bakterien und Pilzen) interagieren können. Dringt ein Pathogen in einen Organismus ein, wird dieser durch die Rezeptoren der Phagozyten erkannt und an der Kontaktstelle kommt es zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Dies führt dazu, dass die Zellmembran des Phagozyten das Pathogen vollständig umschließt und es schließlich intrazellulär abgebaut wird. Dieser Gesamtprozess wird als Phagozytose bezeichnet (Drössler, 1988).

Um der Immunabwehr des Wirts zu entgehen, verfügt *C. albicans* über zahlreiche Virulenzfaktoren. Hierzu zählen auch die Histidinkinase Cos1, welche als Target von Ambruticin vermutet wird, sowie die MAPK Hog1, die nach der Behandlung mit Ambruticin VS-3 sowohl in CAF2-1 als auch im Stamm 1386 aktiviert wurde (Kap. 3.3). So konnte eine Studie zeigen, dass im Mausmodell die Virulenz einer $\Delta cos1$ -Mutante im Vergleich zum Referenzstamm um ca. 25 % reduziert war (Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Eine $\Delta hog1$ -Mutante wurde sogar als avirulent im Mausmodell beschrieben (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Zudem war zu Beginn der Arbeit bekannt, dass Ambruticin S die Pathogenität von *C. albicans* beeinflusst. Bereits Ende der siebziger Jahre konnte gezeigt werden, dass die Überlebensdauer von *Candida*-infizierten Mäusen durch eine Behandlung der Tiere mit Ambruticin S von 5,7 auf 15,9 Tagen gesteigert werden konnte (Ringel, 1978).

Um die Bedeutung von Ambruticin VS-3 für die Virulenz von *C. albicans* zu überprüfen, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelt werden, ob die Testsubstanz die Interaktion des pathogenen Hefepilzes mit Phagozyten beeinflussen kann. Hierzu wurde mit Hilfe eines fluorimetrischen Phagozytose-Assays der Effekt von Ambruticin VS-3 auf die Internalisierung der *C. albicans*-Stämme 1386, CAF2-1 und der $\Delta cos1$ -Mutante durch murine Makrophagen (Zelllinie RAW264.7) untersucht (Kap. 3.5). Tatsächlich zeigte sich beim Stamm 1386 nach einer Vorinkubation der Hefen mit der Testsubstanz über Nacht

eine signifikante Steigerung der Phagozytoseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 24). Wurde diese Vorinkubation der Hefe nicht durchgeführt, sondern die Substanz erst direkt zum Infektionsansatz zugegeben, konnte hingegen keine Veränderung der Phagozytose verzeichnet werden (Abb. 23). Dies lässt vermuten, dass die beobachteten Effekte auf eine Beeinflussung der Hefen durch Ambruticin VS-3 zurückzuführen sind. Ein Effekt von Ambruticin VS-3 auf die Makrophagen ist demgegenüber unwahrscheinlich. Überdies scheint eine längere Inkubationszeit der Hefen mit der Substanz erforderlich zu sein.

Des Weiteren wurde, wie erwartet, die Phagozytose der $\Delta cos1$ -Mutante, welcher das vermutete Target von Ambruticin VS-3 fehlt, durch die Substanzzugabe unter allen getesteten Bedingungen nicht beeinflusst (Abb. 24). Allerdings konnten auch beim Referenzstamm CAF2-1 keine Effekte beobachtet werden, so dass hier, anders als beim Stamm 1386, die zur Phagozytose führende Aktivierung der Makrophagen durch die Behandlung der Hefen mit Ambruticin VS-3 nicht verändert wurde. Dies kann dadurch erklärt werden, dass CAF2-1 im Vergleich zum Stamm 1386 schon in den vorangegangenen Untersuchungen weniger empfindlich auf Ambruticin VS-3 reagierte.

Zusammenfassend hierzu kann gesagt werden, dass die Vorbehandlung des sensitiveren Stammes 1386 mit Ambruticin VS-3 zu einer verbesserten Aufnahme der Hefen durch die Phagozyten führte. Da die Zusammensetzung der Hefezellwand eine wichtige Rolle bei der Erkennung des Pathogens durch Immunzellen spielt, wäre es denkbar, dass sich das Erkennungsmuster der Zellwand dieser Hefen durch die Substanzbehandlung verändert hat. Die Tatsache, dass das potentielle Target von Ambruticin VS-3, die Histidinkinase Cos1, an der Regulation der Zellwandbiosynthese beteiligt ist (Kruppa *et al.*, 2003), könnte ein Hinweis hierauf sein. Zudem ist bekannt, dass eine $\Delta hog1$ -Mutante gegenüber Zellwandinhibitoren resistent ist und eine Beteiligung des HOG-Signalweges an der Zellwandbiosynthese ebenfalls angenommen wird (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Interessanterweise wurden Gene, kodierend für Proteine der Zellwandbiosynthese, bei der Behandlung mit Ambruticin VS-3 erhöht transkribiert (Kap. 4.1.4). Das lässt vermuten, dass die Zellwandbiosynthese durch Ambruticin VS-3 verändert wird, was wiederum eine Veränderung der Zellwandstruktur zur Folge hätte. Die zwei wichtigsten Immunstimulanzen der Zellwand in *C. albicans* sind Mannane und Glukane. Die Mannane liegen dabei schützend auf den Glukanen. Durch eine Veränderung der Zellwandstruktur könnte es zu einer Exponierung der Glukane kommen, wodurch die Hefen besser durch die Phagozyten erkannt und die Immunantwort gesteigert werden würde. Beispielsweise führt

Caspofungin, ein Inhibitor der β -Glukansynthese, zu einer Veränderung des Zellwandaufbaus bei *C. albicans*. Komponenten der *Candida*-Zellwand bleiben nach Caspofungin-Behandlung ungeschützt und lösen dadurch eine starke Immunantwort aus (Wheeler & Fink, 2006).

4.3. Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkung von Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Substanzen Ambruticin VS-3, Jerangolid A und Fludioxonil in den *Candida*-Wildstämmen zu einer Aktivierung des HOG-Signalweges führen. Es wurde gezeigt, dass die Glycerinproduktion durch die Substanzbehandlung induziert (Kap. 4.1.2) und die MAPK Hog1 aktiviert wird (Kap. 4.1.3). Die $\Delta cos1$ -Mutante zeigte bei keiner der Untersuchungen eine Veränderung (Kap. 3.2.1, 3.3), was darauf hinweist, dass das Target der Substanzen in *C. albicans* diese Histidinkinase Typ III Nik1/Cos1 ist.

Interessante Ansätze für weiterführende Untersuchungen lieferten die Transkriptionsanalysen. Die erhöhte Transkription der MAPK-Gene *MKC1* und *CEK1* sowie der Gene kodierend für Proteine der Zellwandbiosynthese sind erwähnenswert. Ob durch die Behandlung mit den Testsubstanzen die MAPK Mkc1 und Cek1 phosphoryliert vorliegen, könnte durch eine Analyse des Phosphorylierungsstatus der beiden MAPK mittels Western-Blot ermittelt werden. Ob tatsächlich die Zellwandstrukturen verändert werden, könnte durch durchflusszytometrische Analysen näher untersucht werden. Dabei könnten die Zellwandglukane mit beispielsweise spezifischen Antikörpern markiert werden, um den Grad der Exponierung zu detektieren.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der aus der Transkriptionsanalyse hervorging, war die reprimierte Expression von Hyphengenen. Morphologieanalysen zum Einfluss der Testsubstanzen könnten mit Hilfe der Mikroskopie durchgeführt werden. Der Einsatz von Hyphen-induzierenden Stimulanzien wie N-Acetylglukosamin oder Serum zum Vergleich würde die Untersuchungen unterstützen.

Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung des Einflusses der Substanzen bietet die Expression des *COS1*-Gens in der nicht-pathogenen Hefe *S. cerevisiae*, der diese Histidinkinase fehlt und welche resistent ist. Durch eine Übertragung der Sensitivität für die Testsubstanzen würde der Nachweis erbracht, dass diese Histidinkinase das Target für die Testsubstanzen ist. In einer Arbeit von Gremmer (2008) wurde die entsprechende Transformante bereits hergestellt und für Fludioxonil der Nachweis der Sensitivitäts-

übertragung erbracht. Künstlich erzeugte Deletionen oder Mutationen im *COS1*-Gen mit anschließender Expression in *S. cerevisiae* könnten genutzt werden, um herauszufinden, welche der Proteindomänen die Angriffspunkte der Substanzen bei Nik1/Cos1 darstellen (Abb. 6).

Die Untersuchungen im Phagozytose-Assay zeigten, dass eine Vorinkubation des Stammes 1386 mit Ambruticin VS-3 zu einer erhöhten Phagozytoseaktivität durch Makrophagen führte, was bei CAF2-1 nicht beobachtet wurde. Durch den Einsatz von höheren Konzentrationen der Testsubstanz könnte überprüft werden, ob eine erhöhte Phagozytoseaktivität auch bei CAF2-1 erzielt werden kann. Ergänzend dazu wären Untersuchungen von Jerangolid A und Fludioxonil im Phagozytostest im Vergleich zu Ambruticin VS-3 interessant.

5. Literaturverzeichnis

Alex, L. A., Korch, C., Selitrennikoff, C. P. & Simon, M. I. (1998). *COS1*, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7069-7073.

Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M. & Nombela, C. (1999). Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 3058-3068.

Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M. & Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J* **16**, 2179-2187.

Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. & Pla, J. (2005). The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **151**, 1033-1049.

Arima, K., H., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A. & Tamura, G. (1964). Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*. *Agr Biol Chem* **28**, 575-776.

Arima, K., H., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A. & Tamura, G. (1965). Studies on pyrrolnitrin. I. Isolation and properties of pyrrolnitrin. *J Antibiotics (Tokyo) Ser A* **18**, 201-204.

Arndt, K. T., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1989). A suppressor of a *HIS4* transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* **56**, 527-537.

Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J. & Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**, 57-69.

Bode, H. B. & Müller, R. (2006). Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 577-588.

Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E. & Woods, C. M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* **55**, 2325-2333.

Bourges, I., Horan, S. & Meunier, B. (2005). Effect of inhibition of the bc1 complex on gene expression profile in yeast. *J Biol Chem* **280**, 29743-29749.

Bourret, R. B., Hess, J. F., Borkovich, K. A., Pakula, A. A. & Simon, M. I. (1989). Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *J Biol Chem* **264**, 7085-7088.

- Bro, C., Regenbreg, B. & Nielsen, J. (2004).** Genome-wide transcriptional response of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with an altered redox metabolism. *Biotechnol Bioeng* **85**, 269-276.
- Calderone, R. A. (2002).** *Candida and Candidiasis*. Washington D.C.: ASM Press.
- Calera, J. A., Choi, G. H. & Calderone, R. A. (1998).** Identification of a putative histidine kinase two-component phosphorelay gene (*CaHK1*) in *Candida albicans*. *Yeast* **14**, 665-674.
- Calera, J. A. & Calderone, R. A. (1999).** Identification of a putative response regulator two-component phosphorelay gene (*CaSSK1*) from *Candida albicans*. *Yeast* **15**, 1243-1254.
- Calera, J. A., Zhao, X. J. & Calderone, R. (2000).** Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**, 518-525.
- Campbell, N. A. (1998).** *Biologie*, 1. korrigierte edn: Spektrum Akademischer Verlag.
- Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J. & Heitman, J. (1999).** The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* **13**, 3271-3279.
- Carrillo-Munoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A. & Quindos, G. (2006).** Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* **19**, 130-139.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martinez, J. P. (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-180.
- Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B. & Entian, K. D. (1999).** The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**, 740-752.
- Chauhan, N., Latge, J. P. & Calderone, R. (2006).** Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* **4**, 435-444.
- Chauhan, N. & Calderone, R. (2008).** Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi. *Infect Immun* **76**, 4795-4803.
- Cheetham, J., Smith, D. A., da Silva Dantas, A., Doris, K. S., Patterson, M. J., Bruce, C. R. & Quinn, J. (2007).** A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **18**, 4603-4614.
- Chiang, L. Y., Ejzykowicz, D. E., Tian, Z. Q., Katz, L. & Filler, S. G. (2006).** Efficacy of ambruticin analogs in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3464-3466.
- Connor, D. T., Greenough, R. C. & von Strandtmann, M. (1977).** W-7783, a unique antifungal antibiotic. *J Org Chem* **42**, 3664-3669.

- Costenoble, R., Valadi, H., Gustafsson, L., Niklasson, C. & Franzen, C. J. (2000).** Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1483-1495.
- Cowen, L. E. & Steinbach, W. J. (2008).** Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* **7**, 747-764.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (1998).** Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**, 2713-2721.
- Cutler, N. S., Pan, X., Heitman, J. & Cardenas, M. E. (2001).** The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol Biol Cell* **12**, 4103-4113.
- Dongo, A., Bataille-Simoneau, N., Champion, C., Guillemette, T., Hamon, B., Iacomini-Vasilescu, B., Katz, L. & Simoneau, P. (2009).** The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide amburicin. *Appl Environ Microbiol* **75**, 127-134.
- Drössler, K. (1988).** *Immunologie*, 2. überarbeitete edn. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D., Nombela, C. & Pla, J. (2006).** The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**, 347-358.
- Enjalbert, B., Smith, D. A., Cornell, M. J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A. J. & Quinn, J. (2006).** Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**, 1018-1032.
- Ernst, J. F. (2000).** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146** (Pt 8), 1763-1774.
- Fan, J., Whiteway, M. & Shen, S. H. (2005).** Disruption of a gene encoding glycerol 3-phosphatase from *Candida albicans* impairs intracellular glycerol accumulation-mediated salt-tolerance. *FEMS Microbiol Lett* **245**, 107-116.
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **10**, 226-236.
- Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993).** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K. & Yamaguchi, I. (2000).** Fungicide Resistance and Osmotic Stress Sensitivity in os Mutants of *Neurospora crassa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **67**, 125-133.

- Gehmann, K., Nyfeler, R., Leadbeater, A. J., Nevill, D. & Sozzi, D. (1990).** CGA 173506: a new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control. *Brighton Crop Prot Conf Pests Dis* **2**, 399–406.
- Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Hofle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. (1982).** Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1101-1103.
- Gerth, K., Washausen, P., Hofle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. (1996).** The jerangolids: A family of new antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties of jerangolid A. *J Antibiot (Tokyo)* **49**, 71-75.
- Ghannoum, M. A. & Rice, L. B. (1999).** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 501-517.
- Gozalbo, D., Roig, P., Villamon, E. & Gil, M. L. (2004).** *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**, 117-135.
- Gremmer, K. (2008).** Klonierung und Expression der Histidinkinase CaNik1/Cos1 aus *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Targetidentifikation, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung*. Braunschweig: Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven.
- Gronewold, T. M., Sasse, F., Lunsdorf, H. & Reichenbach, H. (1999).** Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells. *Cell Tissue Res* **295**, 121-129.
- Hayashi, J., Nishikawa, K., Hirano, R., Noguchi, T. & Yoshimura, F. (2000).** Identification of a two-component signal transduction system involved in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol* **44**, 279-282.
- Haynes, K. (2001).** Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **9**, 591-596.
- Höfle, G., Steinmetz, H., Gerth, K. & Reichenbach, H. (1991).** Ambruticins VS: New Members of the Antifungal Ambruticin Family from *Sorangium cellulosum*. *Liebigs Ann Chem*, 941-945.
- Hohmann, S. (2002a).** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-372.
- Hohmann, S. (2002b).** Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol* **215**, 149-187.
- Hu, Y., Farah, C. S. & Ashman, R. B. (2006).** Isolates of *Candida albicans* that differ in virulence for mice elicit strain-specific antibody-mediated protective responses. *Microbes Infect* **8**, 612-620.
- Hull, C. M. & Johnson, A. D. (1999).** Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-1275.

- Kayingo, G. & Wong, B. (2005).** The MAP kinase Hog1p differentially regulates stress-induced production and accumulation of glycerol and D-arabitol in *Candida albicans*. *Microbiology* **151**, 2987-2999.
- Kayingo, G., Martins, A., Andrie, R., Neves, L., Lucas, C. & Wong, B. (2009).** A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. *Microbiology* **155**, 1547-1557.
- Kende, A. S., Mendoza, J. S. & Fujii, Y. (1993).** Total synthesis of natural (+)-ambruticin. *Tetrahedron* **49**, 8015-8038.
- Klippel, N. & Bilitewski, U. (2007).** Phagocytosis assay based on living *Candida albicans* for the detection of effects of chemicals on macrophage function. *Anal Lett* **40**, 1400 - 1411.
- Klippel, N. (2008).** Interaktionen des humanpathogenen Hefepilzes *Candida albicans* mit Phagozyten. In *Fakultät für Lebenswissenschaften*, pp. 115. Braunschweig: Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Knauth, P. (2000).** Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Ambruticin VS-3. Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina.
- Knauth, P. & Reichenbach, H. (2000).** On the mechanism of action of the myxobacterial fungicide ambruticin. *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 1182-1190.
- Kruppa, M., Goins, T., Cutler, J. E. & other authors (2003).** The role of the *Candida albicans* histidine kinase (*CHK1*) gene in the regulation of cell wall mannan and glucan biosynthesis. *FEMS Yeast Res* **3**, 289-299.
- Kruppa, M., Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F. & Calderone, R. (2004).** The histidine kinases of *Candida albicans*: regulation of cell wall mannan biosynthesis. *FEMS Yeast Res* **4**, 409-416.
- Kruppa, M. & Calderone, R. (2006).** Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res* **6**, 149-159.
- Kurtzman, C. P., Fell, J.W (1998).** *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th ed. edn. Amsterdam: Elsevier Science.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. & Liu, H. (2001).** DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **276**, 48988-48996.
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Harcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. & Thomas, D. Y. (1997).** Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol* **7**, 539-546.
- Lee, C. M., Nantel, A., Jiang, L., Whiteway, M. & Shen, S. H. (2004).** The serine/threonine protein phosphatase SIT4 modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **51**, 691-709.

- Levine, H. B., Ringel, S. M. & Cobb, J. M. (1978).** Therapeutic properties of oral ambruticin (W7783) in experimental pulmonary coccidioidomycosis of mice. *Chest* **73**, 202-206.
- Li, D., Gurkovska, V., Sheridan, M., Calderone, R. & Chauhan, N. (2004).** Studies on the regulation of the two-component histidine kinase gene *CHK1* in *Candida albicans* using the heterologous lacZ reporter gene. *Microbiology* **150**, 3305-3313.
- Liu, W., Leroux, P. & Fillinger, S. (2008).** The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genet Biol* **45**, 1062-1074.
- Lively, D. H., Gorman, M., Haney, M. E. & Mabe, J. A. (1966).** Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. I. Biosynthesis of pyrrolnitrin. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **6**, 462-469.
- Lockhart, S. R., Pujol, C., Daniels, K. J., Miller, M. G., Johnson, A. D., Pfaller, M. A. & Soll, D. R. (2002).** In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**, 737-745.
- Lorenz, M. C., Bender, J. A. & Fink, G. R. (2004).** Transcriptional Response of *Candida albicans* upon Internalization by Macrophages. *Eukaryot Cell* **3**, 1076-1087.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H. (1994).** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-245.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M. (2000).** Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 1511-1519.
- Martinez, S. E., Beavo, J. A. & Hol, W. G. (2002).** GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv* **2**, 317-323.
- Molero, G., Diez-Orejas, R., Navarro-Garcia, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sanchez-Perez, M. & Nombela, C. (1998).** *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol* **1**, 95-106.
- Monge, R. A., Roman, E., Nombela, C. & Pla, J. (2006).** The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**, 905-912.
- Moran, C., Grussemeyer, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., Jr. & Reed, S. D. (2009).** *Candida albicans* and non-albicans bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* **28**, 433-435.
- Morschhauser, J., Virkola, R., Korhonen, T. K. & Hacker, J. (1997).** Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 349-355.

- Moskowitz, S. M., Ernst, R. K. & Miller, S. I. (2004).** PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol* **186**, 575-579.
- Motoyama, T., Kadokura, K., Ohira, T., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I. & Kudo, T. (2005a).** A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genet Biol* **42**, 200-212.
- Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I. & Kudo, T. (2005b).** An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr Genet* **47**, 298-306.
- Müller, J. & Melchinger, W. (2006).** Ultrastructural characters defining the terms 'yeast cell', 'pseudomycelium' and 'true mycelium' in *Candida albicans*. *Mycoses* **49 Suppl 2**, 24-30.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H. & Yamada-Okabe, H. (1998).** Isolation of *CaSLN1* and *CaNIK1*, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* **144 (Pt 2)**, 425-432.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Pla, J. & Nombela, C. (1995).** Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**, 2197-2206.
- Navarro-Garcia, F., Eisman, B., Fiuza, S. M., Nombela, C. & Pla, J. (2005).** The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* **151**, 2737-2749.
- Nevoigt, E. & Stahl, U. (1997).** Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 231-241.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007).** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**, 461-477.
- Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986).** Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5909-5913.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986).** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7850-7854.
- Noguchi, R., Banno, S., Ichikawa, R., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I. & Fujimura, M. (2007).** Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **44**, 208-218.

Nose, M. & Arima, K. (1969). On the mode of action of a new antifungal antibiotic, pyrrolnitrin. *J Antibiot (Tokyo)* **22**, 135-143.

Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K. & Yamaguchi, I. (2001). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci* **57**, 437-442.

Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Yamada-Okabe, H. & Yamaguchi, I. (2002). Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 2209-2215.

Odds, F. C., Brown, A. J. & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**, 272-279.

Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K. & Nakase, T. (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Res* **21**, 4039-4045.

Okada, A., Banno, S., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I. & Fujimura, M. (2005). Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Pesticide Science Society of Japan* **30**, 378-383.

Ota, I. M. & Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**, 566-569.

Pahlman, A. K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S. & Adler, L. (2001). The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**, 3555-3563.

Pfoertner, S., Jeron, A., Probst-Kepper, M. & other authors (2006). Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. *Genome Biol* **7**, R54.

Phan, Q. T., Belanger, P. H. & Filler, S. G. (2000). Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun* **68**, 3485-3490.

Pillonel, C. & Meyer, T. (1997). Effect of Phenylpyrroles on Glycerol Accumulation and Protein Kinase Activity of *Neurospora crassa*. *Pestic Sci* **49**, 229-236.

Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C. & Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**, 865-875.

Prick, T. (2006). Osmosensitivität der Autophagie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* - Parallelen und Unterschiede zur Säugerleber. In *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Reichenbach, H. (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**, 149-156.

Reinhardt, K. (2006). Untersuchungen zum Einfluss von Umweltbedingungen auf die intrazelluläre Glycerinkonzentration von *Saccharomyces cerevisiae*. In *Targetidentifikation, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung*. Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Ringel, S. M., Greenough, R. C., Roemer, S., Connor, D., Gutt, A. L., Blair, B., Kanter, G. & von, S. (1977). Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 371-375.

Ringel, S. M. (1978). In vitro and in vivo studies of ambruticin (W7783): new class of antifungal antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **13**, 762-769.

Roeder, A. (2004). Untersuchung der Interaktion von Makrophagen mit dem humanpathogenen Hefepilz *Candida albicans*: Toll-like Rezeptoren und NF- κ B Aktivierung. In *Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität zu München*, pp. 87. München: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Roman, E., Nombela, C. & Pla, J. (2005). The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**, 10611-10627.

Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Ninfa, A. J., Allen, N. E., Jungheim, L. N., Nicas, T. I. & Chakrabarty, A. M. (1993). Inhibitors of two-component signal transduction systems: inhibition of alginate gene activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 965-969.

San Jose, C., Monge, R. A., Perez-Diaz, R., Pla, J. & Nombela, C. (1996). The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**, 5850-5852.

Santos, J. L. & Shiozaki, K. (2001). Fungal histidine kinases. *Sci STKE* **2001**, RE1.

Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T. M. & Reichenbach, H. (1998). The chondramides: cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1559-1563.

Sasse, F., Steinmetz, H., Heil, J., Hofle, G. & Reichenbach, H. (2000). Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 879-885.

Schmelzle, T. & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-262.

Schneider, I. (2001). Einfluss von Stressfaktoren auf die Regulation der Glycerin-Bildung und -Sekretion am Beispiel Weinhefen. In *Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement*, pp. 148. Giessen: Justus-Liebig Universität Giessen.

- Selitrechnikoff, C. P., Alex, L., Miller, T. K., Clemons, K. V., Simon, M. I. & Stevens, D. A. (2001).** *COS-I*, a putative two-component histidine kinase of *Candida albicans*, is an in vivo virulence factor. *Med Mycol* **39**, 69-74.
- Shadomy, S., Dixon, D. M., Espinel-Ingroff, A., Wagner, G. E., Yu, H. P. & Shadomy, H. J. (1978).** In vitro studies with ambruticin, a new antifungal antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **14**, 99-104.
- Shubitz, L. F., Galgiani, J. N., Tian, Z. Q., Zhong, Z., Timmermans, P. & Katz, L. (2006).** Efficacy of ambruticin analogs in a murine model of coccidioidomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3467-3469.
- Simpkin, K. G. (1985).** Inhibition of growth and uptake of amino acids in the yeast, *Candida parapsilosis*, by ambruticin. *Sabouraudia* **23**, 425-432.
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F. & Calderone, R. (2004).** SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* **72**, 2390-2394.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. & Soll, D. R. (1987).** "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 189-197.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. & other authors (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & Lopez-Goni, I. (1998).** A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* **29**, 125-138.
- Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Enger, L., Highley, K. & Soll, D. R. (1998).** The two-component hybrid kinase regulator *CaNIK1* of *Candida albicans*. *Microbiology* **144** (Pt 10), 2715-2729.
- Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schafer, W. & Hube, B. (2000).** Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Mycoses* **43 Suppl 2**, 17-21.
- Tang, W. & Eisenbrand, G. (1992).** *Chinese Drugs of Plant Origin, Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine*. Berlin etc.: Springer Verlag.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tripathi, R. K. & Gottlieb, D. (1969).** Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *J Bacteriol* **100**, 310-318.

Urban, C. (2004). Thioredoxin Peroxidase des Humanpathogens *Candida albicans*: Ein differenziell lokalisiertes und multifunktionelles Enzym. In *Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik*, pp. 95. Stuttgart: Universität Stuttgart.

Valenzuela, L., Aranda, C. & Gonzalez, A. (2001). TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* **183**, 2331-2334.

Vetcher, L., Menzella, H. G., Kudo, T., Motoyama, T. & Katz, L. (2007). The antifungal polyketide ambruticin targets the HOG pathway. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3734-3736.

Wesolowski, J., Hassan, R. Y., Hodde, S., Bardroff, C. & Bilitewski, U. (2008). Sensing of oxygen in microtiter plates: a novel tool for screening drugs against pathogenic yeasts. *Anal Bioanal Chem*.

Wesolowski, J., Hassan, R. Y., Reinhardt, K., Hodde, S. & Bilitewski, U. (2009). Antifungal compounds redirect metabolic pathways in yeasts: metabolites as indicators of modes of action. *J Appl Microbiol*.

Wheeler, R. T. & Fink, G. R. (2006). A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* **2**, e35.

Wimalasena, T. T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Brown, A. J. & Archer, D. B. (2008). Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1235-1247.

Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 7243-7247.

Yoshimi, A., Tsuda, M. & Tanaka, C. (2004). Cloning and characterization of the histidine kinase gene *Dic1* from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Mol Genet Genomics* **271**, 228-236.

Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y. & Tanaka, C. (2005). Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **4**, 1820-1828.

Zhang, Y., Lamm, R., Pillionel, C., Lam, S. & Xu, J. R. (2002). Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* *os-2* gene encodes a *HOG1* mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Environ Microbiol* **68**, 532-538.

Zordan, R. E., Galgoczy, D. J. & Johnson, A. D. (2006). Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12807-12812.

6. Anhang

6.1. Haushaltsgene von *C. albicans* und *S. cerevisiae*

Tab. 13: Auf dem DNA-Chip als Haushaltsgene verwendete Gene von *C. albicans* (Kap. 2.2.8.1)

Oligo Name	Oligo Sequenz	Gen ID	Gen Symbol	candidaDB_acc	Beschreibung
CA01245_01	ATAAAATAGATTCACAAAT CAACATTGCAGAAGTTTGG AAATTATCAGTGCAGAAAT TGGTGTTCGCGC	orf19.3704	DBP6		RNA helicase required for 60S ribosomal subunit assembly (by homology)
CA01289_01	ATACTGCTGTTGGTGCTGA TAAACTTAAGCCTTTGGAT GTTTATGATGGAATGTATA AGGAACAAGTACA	orf19.3350	IPF4814	CA0986	similar to <i>S. cerevisiae</i> Mrp20p ribosomal protein of the large subunit, mitochondrial (by homology)
CA02108_01	TCAAGAAGAACGATTTGAC CATTGAATGTGAATCAGCT GCTTTACCAGATGCTGAAT TACAAGCTTTTAT	orf19.2435	SSE1	CA1911	heat shock protein of HSP70 family (by homology)
CA02132_01	GTGGTTGATTCTACATTAA CATTTGCTGCTAGAAGAAA TGTTCCAGTTAGATATAAT AGAGATTTGGTTG	orf19.4191	IPF7998	CA1941	Ribosomal protein L24 (by homology)
CA02349_01	ATCAACCAGCGATACCAAT AATAATAACAACAACAGTA CCTTTGAATATCAACAAGC TGTCATCGTCCA	orf19.4775	IPF9417	CA2191	similar to <i>S. cerevisiae</i> Hsf1p heat shock transcription factor (by homology)
CA02738_01	CCGACGAAATCCATTCCAA AATCGACGCCAACACTACA AAAAAGACCGTTTGGGC TACTGCTACATTGG	orf19.5698	IPF5446	CA2613	putative ribosomal protein (by homology)
CA03035_01	ATTATTAAGTCACCTATC TTGATAGATCCGATGTTAC TGCCCGAGTCATTGGAATT AAAAGAGGGTTTT	orf19.1967	IMG1	CA2945	Ribosomal protein, mitochondrial (by homology)
CA03399_01	AGATCGAAATCAACTACTG CTAGAGCTCCATTGGATAT TAGTCATGCAGCTGATTTT GAGTTATTATCAG	orf19.2331	ADA2	CA3340	general transcriptional adaptor or co-activator (by homology)
CA04053_01	CATGCCAACCATTTTGATC TTTTTCGCCATCAAAGGTT GTGATGAAGAATTTTTCAG TAACTTTGGCAA	orf19.3664	HSP31	CA4034	heat shock protein (by homology)
CA04218_01	GTGACGATTCACCAAAACA CATTTTGAGAATAGCTATT GAAATCGAGGCTGAAGTA TACAAGAGCGAATA	orf19.4537	DST1	CA4196	RNA polymerase II elongation factor (by homology)
CA04302_01	TTGGATATTGAAGATGACA AAAATGGCAAGGTAAACG AGACATATGACGAAAGTGA TTTGCATCCATCCA	orf19.6672	MDJ1	CA4275	Heat shock protein - chaperone (by homology)
CA05902_01	GATAAAGCTCATCTAACTC ATTCCCCTTCATCTATTTT AGCAAACCTGCTCCAATCA AATTTGGATCAAG	orf19.5389	FKH1	CA5753	Fork head protein type transcription factor

Tab. 14: Auf dem DNA-Chip als Haushaltsgene verwendete Gene von *S. cerevisiae* (Kap. 2.2.8.1)

Oligo Name	Oligo Sequenz	Systema- tischer Name	Gen Symbol	Beschreibung
YBL092W_01	GTTAGAAGAAGATTGAGAGGTAACATC TCTCAACCAAAGATCGGTTACGGTTCT ACAAGAAGACCAAGT	YBL092W	RPL32	ribosomal protein L32
YBR181C_01	GGGTGAAAAGACTTACACCAAGGCTCC AAAGATCCAAAGATTGGTTACTCCTCAA AGATTGCAAAGAAAG	YBR181C	RPS6B	ribosomal gene product S6B (S10B) (rp9) (YS4)
YFL039C_01	AATCTGCCGGTATTGACCAAACTACTTA CAACTCCATCATGAAGTGTGATGTGCA TGCCGTAAGGAATT	YFL039C	ACT1	actin
YJL061W_01	AAGAGCCAAAACGAATGGGATGAGCTA CGCAAAATGCTTGAAATAGATTCAAAGA TAATTAAGAATGCA	YJL061W	NUP82	82 kDa protein, with putative coiled-coil domain, has carboxy-terminal domain, containing heptad repeats, that binds Nsp1p nuclear pore complex subunit nucleoporin
YLL026W_01	TCGTTTGAAGGAAATTGAAGAGAGATT CGAGCAAAATGATAAACATTACAAGTTG AATTTAACTCAAGAG	YLL026W	HSP104	heat shock protein 104
YLL039C_01	TCTACTCTTCACCTGGTGTGAGACTGA GAGGTGGTATGCAAAATTTTGTCAAGA CACTGACAGGTAAGA	YLL039C	UBI4	ubiquitin poly-ubiquitin
YLR212C_01	TTTATAATACAATCATTGGTAATGTAGA ACCTCGTCAGATATCGCGTGTATGAC CAAATTACAACAACG	YLR212C	TUB4	gamma tubulin
YPL016W_01	CAACAAAATTATTCAAAGGTGCTCCTAC CGTCAATTAACATATCCTGTGTTCAAGT AATCAAATGTTTGG	YPL016W	SWI1	zinc finger transcription factor
YJR009C_01	ACTGTCAAGTTGAACAAGGAAACCACC TACGATGAAATCAAGAAGGTTGTCAAG GCTGCCGCTGAAGGTA	YJR009C	TDH2	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
YJL052W_01	GATGCCTCCGCTGGTATCCAATTGTCT CCAAAGTTTCGTCAAGTTGATTTCTGGT ACGATAACGAATACG	YJL052W	TDH1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
YIL115C_01	ATTTAGAATGCAAAAGACATTACGTCAA AAGCTATTGATGTGTCGCCAAAATTA ATCATACTGAAGAG	YIL115C	NUP159	contains coiled-coil domain and repeated motifs typical of nucleoporins nuclear pore complex subunit nucleoporin 159 kDa
YER103W_01	AGAATCAGCTAGAATCGTACGCGTTTA CTTTGAAAAATTCTGTGAGCGAAAATAA CTTCAAGGAGAAGGT	YER103W	SSA4	HSP70 family

6.2. Liste der ausgewählten Gene

Tab. 15: Liste der ausgewählten 70 *C. albicans*-Gene (CA) und 50 *S. cerevisiae*-Gene (Y)

Nr. (Abb. 9)	Oligo Name	Oligo ID	Oligo Sequenz	Gen ID	Gen Symbol	Beschreibung
1	CA00870_01	CA00870_01	TTTTCTTTGCCTTCACCATTTTACCAT TACCATGGATTTACCCACAGAAATT AATCCATTGAGAACAAG	orf19.5753	STL1	sugar transporter (by homology)
2	CA01365_01	CA01365_01	TTCTGACGAAGAAATGGTTCGTGCAA AAGGCTATACTGGTGATATCCACGCA GATGAAGAGCAAGTTTAA	orf19.2020	HXT61	sugar transporter
3	CA01751_01	CA01751_01	GATTGGTGTACACGAGGAAGTTAGAG AAAGTATGGACTCGTTGAATTCAGAA ACCCCTTTACAAAGATGA	orf19.12265	FTH1	iron transporter
4	CA05758_01	CA05758_01	TGGCGATATTGAGCACATCTCTTCTG ATGGAAAAGCCGAAATGGTTGAAGTT GATGAAAATCCGTTTAA	orf19.7094	SNF31	high-affinity glucose transporter (by homology)
5	CA06351_01	CA06351_01	AACGACTGGCGAAAAGTAGTGGGTAA AGACAATTTGCCAAAAGATATTGATCT GTTCAAGATTGTTGA	orf19.5887	NUP85	Nuclear pore protein (by homology)
6	CA02416_01	CA02416_01	GAGAGTTGGATTATTAGAAACAATTAA GTTTTCTGAAACATTTTCCACAATC TCAAGCTGATACTTTT	orf19.1756	GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (by homology)
7	CA05946_01	CA05946_01	AGATTTATCCAGCTTTAGAATCGACTC ATACAACAAGGAACTGACGAATTCA AGGTTGTTGTTGATGAT	orf19.5437	RHR2/ GPP1	DL-glycerol phosphatase
8	CA10079_01	CA10079_01	TGTGATGTCTTAGCTCCATACAGATA CGAATTGGACTTCCCAATTGATGACA AGAAAATCTTAAACACAG	AJ007637	PFK2	6-phosphofructokinase, beta subunit
9	CA05077_01	CA05077_01	CAGTGATAGTTTGAATGAATGGGCCA GTGAATTGTGTTCAATTGAGAAATGTG ATTTTGACTCCACACATT	orf19.5263	SER33	Phosphoglycerate dehydrogenase (by homology)
10	CA02348_01	CA02348_01	ATGAAATTTTGAAGTTGATGATATTG ATGGTAAATGGTGCAAGCAAGACGA GCAAAATGGTCAAGTTGG	orf19.4772	SSU81	protein involved in the HOG1 high-osmolarity signal transduction pathway (by homology)
11	CA06207_01	CA06207_01	GAAGGAAGGAAGGTCAAGTTCTTATA TTCGAACAGGTCTACTGAAACGAGAT CATTTGGACAGTTTTTTTA	orf19.7637	YHB2	flavohemoprotein (by homology)
12	CA04704_01	CA04704_01	TGAAAAGCCTGGTGAAGTGGGTTTTA AAGGTGTCCGTTGGAATTTTGAAAAG TTTATAGTGAACAGAAAA	orf19.4436	GPX4	glutathione peroxidase (by homology)
13	CA10109_01	CA10109_01	TAAAGTTGTCAAGAATGGATTAGTTG ATGCTTCTGGTGTGCTTCATTATTGG CCACTACCGAATGTGCC	AF085694	HSP60	Heat Shock Protein 60 (HSP60)
14	CA00974_01	CA00974_01	GCAACCACAAACCTTTTAGAGGCCAAA AATGGACGAAGAAGGTAAATTGTTGA AAACCAAGCTAAAGGATC	orf19.2666	CaMSN5.5f	Importin-beta family member required for nuclear export of Pho4p and involved in pheromone response pathway, 5-prime end (by homology)
15	CA04811_01	CA04811_01	AATTATCTATCAATTAAGAGAACACAG TGCCGGTTTGAACGTGTGGTAGATGGG ATTACATTTTCTCCTAC	orf19.4833	CaMLS1	malate synthase
16	CA05837_01	CA05837_01	AGTGAAGGCTCCGGCATTACATAGAG GTGGTTTACAAAAAGTGAATAGAAGC TTTCTTAATAATCATTGA	orf19.7388	IPF3329	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Pbs2p tyrosine protein kinase of the MAP kinase kinase family (by homology)
17	CA03033_01	CA03033_01	ATTAGTCATCGCCTTGGTATTCTTAA GTCAATCCTTGCAACACCACAGCTT GTTTTTAAAGTTGTATT	orf19.1969	IPF6291	Secretory Stress Response protein (by homology)
18	CA01391_01	CA01391_01	GTCAAAACAAGTGAAGTCGTTTCTGG AAAGAAACAATCGAAAAGAGTAGCAT GGGGGGTCGATGCCCTGT	orf19.4363	SGD1.3f	Involved in HOG pathway, 3-prime end (by homology)
19	CA01186_01	CA01186_01	TCTCAATGGCTAAAGATGTCTAGTAC TTTCTTGAAGTGGGCTTCTGAACACAG AACATGATGACAGAAAGA	orf19.11010	CYT1	cytochrome-c1 (by homology)

Anhang

20	CA10198_01	CA10198_01	AACTACATCCTTTCCACTTAGTAGGTC CTTCACCATGACCTATATTCACCTTCAT TCAGTCTAATGGACTT	AF285261		cytochrome oxidase subunit 3
21	CA00432_01	CA00432_01	GAAGGTATGGAAGAAGGTGAATTCAC TGAAGCTAGAGAAGACTTGGCTGCTT TAGAGAGAGATTATATTG	CAU38534	TUB1.3	Alpha-1 tubulin, 3- prime end
22	CA00334_01	CA00334_01	ACGATATGTTATTGGAATTGTGCAAT GATCGATATAAACTAATCGTGTGG CGGTGATACTTCCTACAT	AB017784	TUB4.3	gamma-tubulin, 3-prime end
23	Q0045_01	Q0045_01	ATGTATTATCAATGGGTGCTATTTTCT CTTTATTTGCAGGATACTATTATTGAA GTCCTCAAATTTTAGG	Q0045	OXI3	cytochrome c oxidase subunit I
24	YOR231W_01	YOR231W_01	TTTCCATGCTCTTCCGAGAAGATGGC AGCCAATATAGCTCCCTTTGAATTGTT AATGTGGATTTTAACAT	YOR231W	SSP32	MAP kinase kinase (MEK)
25	YHR030C_01	YHR030C_01	TGTGTAGTGAAAAATTGCAATTTAGTT TTGAATCGGTTAATGATATGGAGGAC TTAAAACAAATGGTTAT	YHR030C	BYC2 MPK 1 SLK2	Suppressor of Iyt2
26	YJL164C_01	YJL164C_01	AGAAAACTTGAATGCCGAATTGAGA TTTCCACCATTTTTCAACGAAGATGTA AAGGACCTGTTGAGTAG	YJL164C	PKA1 SRA 3	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (putative)
27	YJL128C_01	YJL128C_01	AATCTTACGGGAACGTGGTGAGAATG GTTTATCTAAAAATGTACCGGCATTAC ATATGGGTGGTTTATAG	YJL128C	HOG4 SFS 4 SSK4	MAP kinase kinase (MEK) may act as a scaffolding protein for Sho1p, Ste11p, and Hog1p
28	YNR031C_01	YNR031C_01	CAAAACCCCTCCAAGAGAGCCAGTG CGGTTGAGCTGTTGATGGATCCTTGG ATTGTACAAATTAGAGAAA	YNR031C		MAP kinase kinase kinase activator of Pbs2p
29	YIL053W_01	YIL053W_01	AAGGTAAGCCTCACCCAGAACCATAC TTAAAGGGTAGAAACGGTTTGGGTTT CCCAATTAATGAACAAGA	YIL053W	GPP1	DL-glycerol-3- phosphatase
30	CA04618_01	CA04618_01	GAGGATTTGTATTACTTGTGATCAAA TTGAATCCAAAATTGCCATTAACCCCTC GACCAGTTAAAGGATA	orf19.6882	IPF9550	similar to Saccharomyces cerevisiae Osm1p osmotic growth protein
31	CA10177_01	CA10177_01	ATCATTCCATTACGACGAGTCTTCCA GTTTATACACTCAATTGGGTAAACACA TGAAACTCAGAAGAGA	U15152	CPH1	Transcription factor
32	CA01724_01	CA01724_01	ATTGTCAGTGCTGGATTAATGAGTCG AGGTATTTGGTTTTTGAATTAGAACA ATATGTTAGACAATGTA	orf19.3227	FTH2	iron transporter (by homology)
33	CA05384_01	CA05384_01	TGTTGGGGCACAATAATGTTTGAATT AAGAGAATCAGAATTAAGAAGAGCCA TTGATGTAAGGTGTTAA	orf19.4985	IPF1764	similar to Saccharomyces cerevisiae Gup1p glycerol transporter (by homology)
34	CA03008_01	CA03008_01	GGTTTGTTACAGCCTTACATAGATCA AGTTTGGTTTATATTGATCAATGTTTG AAAACACCAGTTTCAGA	orf19.4519	SUV3	ATP-dependent RNA helicase, mitochondrial (by homology)
35	CA01154_01	CA01154_01	CTTCCATTGCCTACACTGTTCCAGAA GATTTTCAGAGGTGCCGTAAGATAT TGATCCATTTATTTTGA	orf19.691	GPD2	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (by homology)
36	CA03604_01	CA03604_01	GGATTGGTCACTATTTCCGGTGGTAA ATGGACTACTTACAGAGAAATGGCCC AAGAACTATTGATTACG	orf19.3133	GUT2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial (by homology)
37	CA10047_01	CA10047_01	GGGGTGTCATGCAAGCATTGATTGATT TTGACGGATGGAAGATAAGAATCGA AGATTAACAAAGCTTGA	AF084608	SSK1	Putative reponse regulator two- component
38	CA00363_01	CA00363_01	TAACATTGTTATCATTGGTGGTGGTG ATACTGCTACTGTTGCTAAGAAATAC GGTGTCGTTGAAAAATTA	CAU25180	PGK1	phosphorelay gene Phosphoglycerate kinase
39	CA05320_01	CA05320_01	ATCATGGAGGTGATGAACATGATAAG AGTCATATGAATGAATGGGTCAAAAA ATCTGTTTTGAGTGTTGC	orf19.7021	GPH1	Glycogen phosphorylase (by homology)
40	CA03196_01	CA03196_01	ATGGAGTCACAGCATTATTACCCATG ATTGAAGCTGGTTTAACCGAAGGAAG ACAAGTGAAATTACTATA	orf19.3710	YHB3	flavo-hemoglobin (by homology)
41	CA00946_01	CA00946_01	GGTGAAAAGCAACGTCGAGCTGGCA TGGGAAACCATGGAAGATACATTTCT GGAAATCCAAAACAAATTT	orf19.7732	GPX3	glutathione peroxidase (by homology)

Anhang

42	CA10135_01	CA10135_01	AACCGAAGGTATCTTCGCTACAGGTA GTGGCGATTGTAAGCCAGAAATTGG AAATGGACCAAAAAATAA	AF005741	TUP1	general transcription repressor
43	CA10160_01	CA10160_01	AATTAACAGATTGATTGCCTTGGGATT GAATATTGACGATGATTCAGAAGAAA CTGCTGTTGAACCTGAA	X81025	HSP90	heat shock protein
44	CA00975_01	CA00975_01	AGTTACTTGTCGATAGATGGGCTAAA ATAAGTGGCAATGGAATACAATTGCA AGGAAACGAAGATGACGA	orf19.2665	MSN5.3f	Importin-beta family member required for nuclear export of Pho4p and involved in pheromone response pathway, 3-prime end (by homology)
45	CA04478_01	CA04478_01	AAGGTGTGGAAGTTGTCAAACATCAA AAATGGTCTGGTGCTACCTATATTGA TGGTTTGTGAAGATGGT	orf19.6844	CalCL1	Isocitrate lyase
46	CA05915_01	CA05915_01	TTGGTTCAGTGATCTGCATGATAATG AATTGTTAGATTTGATTCCATTTTGG AAGATTTAGCAAAGCCA	orf19.5406	IPF20031	similar to Saccharomyces cerevisiae Psr2p plasma membrane phosphatase required for sodium stress response (by homology)
47	CA01799_01	CA01799_01	CAGACCATCTTTGGAAGCCAGAGAAA GATTTGAAAAGACTGATGAAACCGCT GAAATTTTATCCAAATAA	orf19.1652	POX4	peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase (by homology)
48	CA01286_01	CA01286_01	TATGTGGTCCACCACCAATGGTTAGT GCTATGAAAAAGCTGCTGTTGAATT AGGATTTCAAAAAGCTAA	orf19.1801	CBR1	Cytochrome-b5 reductase (by homology)
49	CA10197_01	CA10197_01	TGTCTTCGGTACCTACTCGCCGGTT GATCCGCCAATAGTAAATACTCTTTAT TAGGTAGTATTAGATCA	AF285261		NADH dehydrogenase subunit 1
50	CA10195_01	CA10195_01	GCTCTAATCCAACGTACTGGTGTTTA CTATGGTCAATGTAGTGAATTATGTG GGGTTAACCACGGTATGA	AF285261		cytochrome oxidase subunit 2
51	CA00444_01	CA00444_01	TTCAGAAGAAAAGCTTTCTTGCAATTG GTATACTTCTGAAGGTATGGATGAAA TGGAATTTACTGAAGCTG	YSATUBB	TUB2.3	Beta-tubulin, 3-prime end
52	CA05662_01	CA05662_01	GTTGAGTCTCAGTGGATTACTATTATT ACCGATCAGCGATCGATTATTGTCC AGTGGGAAAGTTTATAT	orf19.5363	SAT2	putative glycosyl-transferase involved in osmotolerance (by homology)
53	Q0250_01	Q0250_01	AACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTT TGCTATTCCAAGTTTAGGTATTTAAAGT TGATGCTACTCCTGGT	Q0250	OX11 OXII	cytochrome c oxidase subunit II
54	YNL283C_01	YNL283C_01	GAAAGACAACCTACACATTGTCAACCC CGATAATGTGAGTTCAAATATTGGGA GTAATGTCTCAGAAAGGTG	YNL283C	STA3	contains novel cysteine motif integral membrane protein (putative) similar to SLG1 (WSC1), WSC3 and WSC4
55	YEL060C_01	YEL060C_01	CAGTACAAAGGACATTTTGTTCGATAT CCCTGAAGACACTCCAAATGTTTTAAT CTACAACGGTGGTGGT	YEL060C	CVT1 yscB	vacuolar protease B
56	YLR006C_01	YLR006C_01	TAGCATTGACCGCATCTAACTCTCAG ATGGATAAAAGAAAAGCACTTCTTTCT GGTTGTAACGACTACCT	YLR006C		two-component signal transducer that with Sln1p regulates osmosensing MAP kinase cascade(suppressor of sensor kinase)
57	YOL059W_01	YOL059W_01	ACATGTGAGTTGACCCAAGAATTCCC ATTATTCGAGGCACTCTACCAGATAG TCTACAACAACGTCCGCA	YOL059W	GPD3	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)
58	YHR028C_01	YHR028C_01	GGATACGTAGAATCAAGCGTTCATAA TGTCACCTGCTTTGGCACAAGCAAATA GATTTTTGTTGATGCACG	YHR028C	DPP2	dipeptidyl aminopeptidase B (DPAP B)
59	YLR109W_01	YLR109W_01	TCAGCCAAAGTGATGCTGACAGTGAA TCTTGTAAGATGCCACAACAGTTGA ATGGTCCAAATTAATTTTC	YLR109W	cTPxIII	alkyl hydroperoxide reductase EC 1.11.1.-
60	CA05368_01	CA05368_01	TCAAAAATGTAGTACTTGATTAACTC CATTTTTGGGTGATCACCTGGTGGT AAAGAATCAATTGCCAA	orf19.5005	OSM2	Osmotic growth protein (by homology)
61	CA05550_01	CA05550_01	GGTGACATATTTGCAGAAATGGTATGT CGGATATTTTGGCCAAGCCATTTACA AAAGATGATTTATATGCA	orf19.971	SKN7	Transcription factor (by homology)

Anhang

62	CA00718_01	CA00718_01	GATTAATGACAGTTTTTCAGTGCTCCC AATTATTGTGATTCTACTGGGAATTTA GGTGGTGTGATTTCATAT	orf19.1673	PPT1	Protein ser/thr phosphatase
63	CA10051_01	CA10051_01	TCAAGGTTCTGGATGGGCTTTTATTG TAAAAACAAAGCCAATGGTGATACT ATTGATGTCATCACCACCT	AF031478	SOD2	Manganese-superoxide dismutase
64	CA10133_01	CA10133_01	AAGGTGAATGGTTTTACGTTCAAGTT CATTTTCATCAGTGATCAAGGTATTAAG ACTTTGACCAACGAAGA	AB006327	CTA1	catalase A, peroxisomal(by homology)
65	CA10106_01	CA10106_01	CGACAAAAAGAGGTGTCTAGAAGAG GGAATGTTTGATTTTATAACCAAACCC ATTTTACCAGATGAACCT	AF013273	HK1	Histidine kinase
66	CA10042_01	CA10042_01	AGTGAATTATTTGCCAATACCAACAAC AATACTAGTACTAGTAATACTGGCGG TAGGACAAATATTAATC	M76585	ERK1	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)
67	CA01472_01	CA01472_01	ATGGCTGTCAAGGAAATTACGTTCCA TGATAGTCAATCGGTTAAACTATTGT GCCCTGATTAAAGAAG	orf19.3776	SSK2	MAP kinase kinase kinase of the high osmolarity signal transduction pathway (by homology)
68	CA02372_01	CA02372_01	AAGAAGTTGGAGTTGTTTTTAAAGAA CGGAAATATTCTGTGGTCCCAACAGC TCCACCAACTTCAAAGTC	orf19.4753	PFK26	6-phosphofructose-2- kinase (by homology)
69	CA10099_01	CA10099_01	TATTTGTTAACATGTGATGCTTCCGGT GTGTTGGCAACAGTCTCCAAATTGAC TAATGCTCAAGTTATGT	U70473	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase
70	CA10100_01	CA10100_01	GGTCGAAGAAGGTGTTTATGACAAAG AACACAAGAGCTGGGCGAAAAAGATC AGAAAAATGCAAAGTGTA	U72980	STE7	MAP Kinase Kinase
71	CA10161_01	CA10161_01	ACCATCAGGAGAAGAGTATATAAAGC TAGAGGAAGAGCTTGGGTTTGGATTA GATTGGTGCTATGTTTAA	X76708	MKC1	ser/thr protein kinase of MAP kinase family
72	CA10103_01	CA10103_01	ATCCCAGAAAAGCCAACAACCTCCAGC TACTACTCCAAACATTCTGCTACAAC TACTACTTCTGAATCAT	U29369	HWP1	Hyphal wall protein
73	Q0275_01	Q0275_01	AGAAATTATCATTTAACAGCTGGACAT CATGTTGGATATGAAACAACTATTATT TATCTACATGTTTTAG	Q0275	OXI2	cytochrome c oxidase subunit III[mitochondrially encoded catalase T
74	YGR088W_01	YGR088W_01	AAATCAGAAACGAGCATATTGTTGAT GCCAAAATTAATCAATATTACTACGTT TATGGTATTAGTCCACT	YGR088W		
75	YKL026C_01	YKL026C	AGAGTACTTGTACGAAAAATACAAAT CACATGGTCTAGTGATTGTGGCCTTT CCCTGTGGTCAATTCCGA	GPX1	11	
76	YDR453C_01	YDR453C_01	GTGGATTAGGTCCAGTTAAAGTTCTT TTGCTTGCTGATAAGAATCATTCTTA TCCAGAGACTATGGCGT	YDR453C	cTPxII	thioredoxin-peroxidase (TPx); reduces H2O2 and alkyl hydroperoxides with the use of hydrogens provided by thioredoxin, thioredoxin reductase, and NADPH EC 1.11.1.-
77	YPL196W_01	YPL196W_02	TTGCTCCAGATAGCAAGGAATTTAGA AGAGTGGGGTATGTATTAGTAATAAA GGATCGTAAAAACGGAAT	OXR1	16	
78	YML054C_01	YML054C_01	ATGAAATTGAAATGTCTATGAGACTAT TAGGTGTTACTAGCATTGCGGAATTG AAGCCTGATCTTTTAGA	YML054C		L-lactate cytochrome c oxidoreductase cytochr ome b2
79	YJL045W_01	YJL045W_01	CAATTGCTAATTTGGATAAAGTAAGAA ATGCTCGCGGCTCACTGAAAACCTCT CAAATCAGGTTGAACAT	YJL045W	SDH1b	Similar to SDH1
80	YER150W_01	YER150W_01	CCTACTTCAGAAACATCGGTTTCTTCT ACACATGATGTGGAGACAAATTCTAA TGCTGCTAACGCAAGAG	YER150W		strongly expressed during stationary phase, and transcription is dependent on MSN2/MSN4.
81	YKL062W_01	YKL062W_01	ATAAGATCCGTTTCATTCAACGGAACG CCTTTTTGCTTGATGTTCTGTGAGAA AAAATTCAGTAGAAGTG	YKL062W		zinc finger protein
82	YML007W_01	YML007W_01	TCAGATATTGATGTGATGTTTATGT TCCGAGCTAATGGCAAAGGCAAAATG TTCAGAAAGAGGGGTTG	YML007W	PAR1 SNQ 3	jun-like transcription factor

Anhang

83	YBL105C_01	YBL105C_01	AGATGAAGTTTTTAACGCTATCCTTAC CGATGAACCCCTTATACCCAATAGATA TGGCAGGTGAGATTGTA	YBL105C	CLY15 HP O2 STT1	Protein Kinase C
84	YPL140C_01	YPL140C_01	TAGGATTAACCTCTTCTGGAGGTTGCT GGAGGGAGATTTCCATTTGAATCTGA CAAAATAACGCAAAACGT	YPL140C	LPI6 SSP3 3	protein kinase
85	YJL005W_01	YJL005W_01	ACAGACTGGAATCTATAATGTCAGCT TTAAGCGGCGGATTTATTGAAGCTAGA CTCTCGGACGGAGGGAAG	YJL005W	CDC35 FIL 1 HSR1 SR A4 TSM018 5	adenylate cyclase
86	YOR008C_01	YOR008C_01	ATTAATATGAAGCGGGAACAAGACAG GATGGAAAAGGAATACCAAGAGGCG ATAAAACCAGTTGAGTACC	YOR008C	HCS77 WS C1	cell wall integrity and stress response component 1
87	YDL235C_01	YDL235C_01	CCATCTTAATGAAATTATATCTATGG ATGACGATGATTTCCGATTTTCTAAAG GTCTAATTATTTCAATT	YDL235C		two-component phosphorelay intermediate
88	YDL022W_01	YDL022W_01	CGTTTACAACAACCTACCCAATGAAGA ACCTGCCGGACATGATTGAAGAATTA GATCTACATGAAGATTAG	YDL022W	DAR1 HOR 1 OSG1 OS R5	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
89	YER062C_01	YER062C_01	CGAAACAGACGAAGTTGAATTCATTT TTGACGACTACTTATATGCTAAGGAC GATCTGTTGAAATGGTAA	YER062C	GPP2	DL-glycerol-3- phosphatase
90	YEL039C_01	YEL039C_01	TCAAACCAGGCTCTGCAAAAAAGGGT GCTACATTGTTTTAAACGAGGTGTCA GCAGTGTCATACAATAGA	YEL039C		iso-2-cytochrome c
91	CA10019_01	CA10019_01	CGACAAGAGTTCTATTGTGTTGGGAT CCAAGGGTGAAGTTGAAAAGTATTTA AAGCATGTACCAAAATAG	AJ243306	FBP1	Fructose-1,6- biphosphatase
92	CA03720_01	CA03720_01	CCCTAATTATTGTGGAGAATTGATAA TTGGGGAGCAGTTATGGGAGTACTG GAAGATTATTTATGTTCA	orf19.726	PPZ1	ser/thr phosphatase required for normal osmoregulation (by homology)
93	CA00144_01	CA00144_01	ATTGTTGTTCATGCTGGTACTGATGAT TATGGTAAAGGTGGTTTTGAAGATTC TAAACTACTGGTCATG	AF046872	SOD1.3	Cu,Zn-superoxide dismutase, 3-prime end
94	CA10114_01	CA10114_01	TCCAACACCTACAACCTACTACAACCTA CTACAACAACAACAGACCATACTACT GTATTGGATGATATATCA	AB006362	SLN1	Two-component signal transducer histidine kinase component
95	CA10252_01	CA10252_01	CGACAAACCGAACAATTGTTACCATT TAGTTCCCATTTATGTGTTATTTGTATC GACTGAGCATACTCAAG	AL033396		histidine kinase
96	CA01235_01	CA01235_01	TTGTTATCAAGTAAGAGCTATTTTGAA AGCAATGGCTAGTGATGCTGGTGCTG TAGATGATTTCTTGGAG	orf19.558	GUT1	Glycerol kinase (by homology)
97	CA02192_01	CA02192_01	GCCATTCTACAATTGAATTATTGAATC CATCTGACTCAGAGGGTGAAGATGGT GAGGAAGATGGAGAATT	orf19.844	STE11	ser/thr protein kinase of the MEKK family (by homology)
98	CA03522_01	CA03522_01	TTCTGAAGCTGTTGAATTGGGAATCA TTTCTAAAGGTGACTCAATTGTTACTG TCCAAGGTTGGACTAGA	orf19.3575	CDC19	pyruvate kinase (by homology)
99	CA10129_01	CA10129_01	ACAACGCTACTGACTCATCACAACAAC AACAACAACAAAAGCAACATCAATAT CAACAGAAATCCCAACAA	U87996	CLA4	protein kinase homolog (by homology)
100	CA10147_01	CA10147_01	GGTTTTTGACCCTAAGAAAAGAATCA GTGCTGTTCAAGGTTTGACCCATCCT TATATGGAGGCATACCAT	X90586	HOG1	Ser/thr protein kinase of MAPK family
101	CA10174_01	CA10174_01	CGTGACGCTTGTAACGCTGACGTCAA GTATTTCAAAGAATCAAACACCAATAC TTTGAGAGTTTATGCTA	M90812	PHR1	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase
102	CA01699_01	CA01699_01	TGAAAAATGGAAATGGTTATTAGTGCT CCTTGTTCAAGGATAAATTGGTGATAT TTTGATTCATGAAGGTGA	orf19.789	PYC2.exon 2	Pyruvate carboxylase 2, exon 2 (by homology)
103	YIL111W_01	YIL111W_01	TATTTTTAGGGTTAGGAATCTCATTTG GGCTCTTTGGTTTATGAGACTATTA GCCAATCCTGAACTCC	YIL111W		cytochrome c oxidase chain Vb
104	YIR037W_01	YIR037W_01	CACCTGTTGACAAGAAAGGCCAACCA TTCCCTTCGACCAATTAAGGGGAAA AGTGGTGCTTATCGTTAA	YIR037W	GPX3 ORP 1	glutathione-peroxidase (putative)

Anhang

105	YLR380W_01	YLR380W_01	GATTGTTTTCTACTAAGAATATCGACGA ATTGCACAAGTTTATCCAACCCCAATA CATCCCTAGGTATCTG	YLR380W	SFH2	Phosphatidylinositol transfer protein with a potential role in lipid turnover; interacts specifically with thioredoxin peroxidase (Tsa2p) and may have a role in oxidative stress resistance
106	YLR205C_01	YLR205C	GCTGGTGCTTTCTATTATCGCGATCT GGGTTCTTTACTTCTTGGTAAAGAGTT TTCTTAGCATAGTATAA	HMX1	12	
107	YDR256C_01	YDR256C_01	CGTGCAAGCAAGAAATCTCTACCGCG TTTTGGGTAAACAACCTGGACAGCAA AAGAACTTGGCATATAAC	YDR256C		catalase A
108	YNL111C_01	YNL111C	CAATTCAAAGATGAACATCCAGGTGG TGATGAAATTATAATGGATTGGGTG GACAAGATGCTACAGAAA	CYB5	14	
109	YCR021C_01	YCR021C_01	CATTTATCCATGTTACTTGCTAATTGC AGTCAGCCGTGATGGCAAATTGCCAA GGCTATCTTTGACAGGA	YCR021C	YRO1	Protein induced by heat shock, ethanol treatment, and entry into stationary phase; located in plasma membrane
110	YMR037C_01	YMR037C_01	AAGTGTCGTAATAGAATCAACAAAGG AACTCGAGGAGAAACCGTTCCACTGT CACATTTGTCCCAAGAGC	YMR037C		zinc finger protein
111	YOR173W_01	YOR173W_01	ACTCAATAAGAAGATTAAGACCATCAT CCCCAGCACTATGACTATAATGTAA ACCCGGACGAGCTAAGA	YOR173W		Non-essential protein containing a HIT (histidine triad) motif; regulated by Msn2p, Msn4p, and the Ras-cAMP-cAPK signalling pathway, transcript accumulates under glucose limitation, similar to Dcs1pJJJ redox regulator
112	YBR216C_01	YBR216C_01	ATGTGCTTAAGACATCTCCCTTCCA TTGGCTAAGACGTCGGTATTATGTGT TTTTAAAGACCTTTCAAG	YBR216C		
113	YJL095W_01	YJL095W_01	ACCATTGATATCGAAATCGGACGAA ATTTTCTGGACGATGCTTCGAGATA AATCCAGAGAAAAGGCCA	YJL095W	LAS3 SAP3 SLK1 SSP 31	MEKK
114	YKL103C_01	YKL103C_01	GAATCACTTTATCACTGGATCCTAAC GGTCATATGGCCACAGATGTCGTAGG AACTGCCCTAGTAGAAGA	YKL103C	APE1 API Y SC1	vacuolar aminopeptidase ysc1
115	YLR113W_01	YLR113W_01	AGCTGCAAATGACACCATTACGGACT ACGGTAACCAAGGCCATACAGTACGCT AATGAGTTCCAACAGTAA	YLR113W	SSK3	MAP kinase
116	YIL147C_01	YIL147C_01	TAAAGTGGATGGTTTACTTTCTACCAA GATGATAAGGCGCGATTAGGTTATA CCTCACCTATTGTCGCT	YIL147C	YPD2	histidine kinase osmosensor that regulates an osmosensing MAP kinase cascade similar to bacterial two-component regulators may play a role in regulating osmotic stability
117	YML016C_01	YML016C_01	TAATGAGCGTCAGCGAAGGTTTATTG TGCTCTTTTGATTGTTAGATCCACTA GATAGTGCAGCTTTGAA	YML016C		
118	YJR104C_01	YJR104C_01	AATCCTTTCAAGAAGACATGGTGC TCCAAGTACGAAAGTCAGACATGTCG GTGACATGGGTAACGTAA	YJR104C	CRS4	Cu, Zn superoxide dismutase
119	YML085C_01	YML085C_01	TTTGGCTGCTTTGAGAAAGAGATTACAT CGAAGTGGGTGCCGACTCATACGCT GAGGAAGAGGAATTTTAA	YML085C		alpha-tubulin
120	YKL141W_01	YKL141W_01	TATTTCTCCACATCTGACCATTACCA GCCACAATTAACCTGGTACCTGTCTT CTCTTCACCGTATTTTCG	YKL141W	CYB3 YKL4	succinate dehydrogenase cytochrome b

Tab. 16: Genannotation der Transkriptom-DNA-Chips aus Kap. 3.4.2/Tab. 12

Gen Symbol	CA Assembly19	Allele to ORF, Contig und Genom. Position	Beschreibung
APR1	orf19.1891	orf19.9447 IPF25433.1 Contig20135:47964..49478	vacuolar aspartic proteinase precursor
ARN1	orf19.2179	orf19.9725 IPF25111.1 Contig20141:33813..35651	iron-siderophore transporter
ATG9	orf19.5974	orf19.13395 IPF21152.1 Contig20236:complement(229413..226555)	required for starvation-induced autophagy
BCK1	orf19.5162	orf19.12629 IPF22091.1 Contig20219:complement(70941..66979)	serine/threonine protein kinase of the MEKK family
BRE1	orf19.976	orf19.8591 IPF26322.1 Contig20080:122227..124272	coiled-coil protein with RING-finger and myosin- like domains
BUD7	orf19.1112	orf19.8709 IPF26191.1 Contig20093:15304..17598	involved in bud-site selection
CEK1	orf19.2886	orf19.10404 IPF14791.2 Contig20162:48780..50051	MAP kinase involved in pheromone signal transduction
CHS8	orf19.5384	orf19.12839 IPF21803.1 Contig20227:complement(30019..26702)	chitin synthase 8
CMK2	orf19.1754	orf19.9323 IPF16060.2 Contig20125:24848..26281	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent ser/thr protein kinase
CRH1	orf19.2706	orf19.10221 IPF24611.1 Contig20158:86016..87377	cell wall protein in family of putative glycosidases
CSI2	orf19.5232	orf19.12697 IPF11270.2 Contig20223:32267..33145	conserved hypothetical protein
CTF4	orf19.6247	orf19.13625 IPF20880.1 Contig20241:complement(101467..98858)	DNA polymerase alpha binding protein
CWH41	orf19.4421	orf19.11899 IPF22852.1 Contig20204:48175..49437	glucosidase I
DDR48	orf19.4082	orf19.11563 IPF23163.1 Contig20196:35426..36064	flocculent specific protein contains NNDDNSYG motif
DIP2	orf19.5106	orf19.12572 IPF22110.1 Contig20218:complement(120932..117987)	beta transducin
ECM15	orf19.7436.1		involved in cell wall biogenesis and architecture
ERG11	orf19.922	orf19.8538 IPF19860.2 Contig20080:8361..9947	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase
FGR34	orf19.7579		conserved hypothetical protein
FGR41	orf19.4910	orf19.12376 IPF22465.1 Contig20215:complement(416035..415283)	hypothetical protein
GCY1	orf19.6757	orf19.14049 IPF20388.1 Contig20254:complement(78720..77833)	similar to mammalian aldo/keto reductases
GFA1	orf19.1618	orf19.9186 IPF17771.2 Contig20123:30481..32622	glucoseamine-6- phosphate synthase
GPD2	orf19.1756	orf19.9325 IPF25561.1 Contig20125:complement(30862..29651)	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
GPP1	orf19.5437	orf19.12892 IPF21745.1 Contig20227:complement(108412..107648)	DL-glycerol-3-phosphatase
HAC1	orf19.2432	orf19.9968 IPF24851.1 Contig20150:5919..6992	transcription factor that binds to CRE motif
HCH1	orf19.3396	orf19.10899 IPF23860.1 Contig20176:8764..9024	high copy Hsp90 supressor
HSP12	orf19.3548.1	orf19.11032.1 IPF23703.1 Contig20183:45859..46056	heat shock protein potentially induced during entry into stationnary phase
HTA1	orf19.6924	orf19.14186 IPF20206.1 Contig20259:complement(7613..7215)	histone H2A
IMD3	orf19.18	orf19.7689 IPF3873.2 Contig20014:complement(2207..1092) orf19.7690 IPF27224.1 Contig20014:complement(2904..2440)	inosine-5'- monophosphate dehydrogenase guanosine nucleotide biosynthesis
IPT1	orf19.4769	orf19.12233 IPF11674.2 Contig20215:104970..106514	necessary for synthesis of mannose-(inositol-P) ₂ -ceramide (M(IP) ₂ C) inositolphosphotransferase 1 mannosyl diphosphorylinositol ceramide synthase

Anhang

ISA2	orf19.6811	orf19.14103 IPF20411.1 Contig20254:complement(187612..186914)	mitochondrial protein required for iron metabolism
KEX2	orf19.4755	orf19.12219 IPF22355.1 Contig20215:complement(72883..70073)	Kexin protease late Golgi endoprotease that processes of alpha-factor
LAS17	orf19.6598		actin assembly factor homolog of WASP, proline-rich protein
LHS1	orf19.5830	orf19.13252 IPF11217.2 Contig20234:complement(96841..94043)	translocation of protein precursors across ER Hsp70 family chaperone
MET15	orf19.5645	orf19.13090 IPF21534.1 Contig20231:complement(18747..17425)	O-acetylhomoserine sulfhydrylase
MRP2	orf19.4023	orf19.11506 IPF23339.1 Contig20194:complement(236762..236415)	mitochondrial ribosomal small subunit protein
NOC2	orf19.5850	orf19.13272 IPF21359.1 Contig20235:complement(21318..19174)	conserved hypothetical protein
NOP58	orf19.1199	orf19.8790 IPF18691.2 Contig20099:complement(46565..45018)	part of small (ribosomal) subunit (SSU) processosome; U3 snoRNP protein
OXR1	orf19.243	orf19.7873 IPF10502.1 Contig20046:complement(27095..26058)	resistance to oxidation
PEA2	orf19.1835	orf19.9393 IPF25485.1 Contig20132:complement(16221..14317)	required for some forms of polarized growth, localized to sites of polarized growth
PHR1	orf19.3829	orf19.11310 IPF23455.1 Contig20192:117993..119639	pH regulated GPI-anchored membrane protein that is required for morphogenesis
PIR1	orf19.220	orf19.7851 IPF15363.2 Contig20045:52307..53464	cell wall structural constituent with tandem repeats
PMC1	orf19.1727	orf19.9295 IPF25700.1 Contig20123:complement(260930..257295)	Ca ²⁺ -transporting P-type ATPase
PMI1	orf19.1390	orf19.8968 IPF19894.1 Contig20113:complement(66934..65609)	mannose-6-phosphate isomerase
PMR1	orf19.7089		calcium/manganese P-type ATPase
PMT2	orf19.6812	orf19.14104 IPF20316.1 Contig20254:complement(190291..188021)	dolichyl-P-mannose-protein mannosyltransferase
POL30	orf19.4616	orf19.12086 IPF22623.1 Contig20212:complement(105708..104929)	accessory factor for DNA polymerase delta Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)
PRB1	orf19.2242	orf19.9783 IPF12896.2 Contig20143:complement(27169..25772)	subtilisin-like endoprotease B
REV1	orf19.4412	orf19.11890 IPF22862.1 Contig20204:complement(30674..27333)	DNA repair protein
RIM20	orf19.4800	orf19.12263 IPF22375.1 Contig20215:181352..183709	Rim101p activating protein
TRP99	orf19.424	orf19.8054 IPF10482.2 Contig20052:32322..32876	putative thioredoxin peroxidase alkyl hydroperoxide reductase
YVH1	orf19.4401	orf19.11879 IPF22890.1 Contig20203:complement(108815..107847)	protein-tyrosine phosphatase
	orf19.5620	orf19.13065 IPF18418.1 Contig20230:192806..193714	conserved hypothetical protein
	orf19.5276	orf19.12741 IPF21952.1 Contig20223:complement(113088..111841)	conserved hypothetical protein
	orf19.4760	orf19.12224 IPF18440.1 Contig20215:complement(82441..81122)	conserved hypothetical protein

Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Mentorin Prof. Dr. Ursula Bilitewski für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, die wissenschaftliche Betreuung und für die stetige und hilfreiche Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank an Prof. Dr. Ludger Beerhues für die freundliche Übernahme des Korreferats und die damit verbundenen Mühen.

Ich bedanke mich bei Richard Calderone, Malcolm Whiteway, Jesús Pla und Claude Selitrennikoff für die Bereitstellung der Deletionsmutanten. Ohne diese Mutanten wäre ein großer Teil meiner Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem bedanke ich mich bei all meinen Kollegen am HZI für die nette Arbeitsatmosphäre und für die tatkräftige Unterstützung. Besonderen Dank schulde ich hierbei:

Dr. Robert Geffers und Claudia Wylegalla danke ich für die Durchführung und Hilfe bei den Transkriptionsanalysen und deren Auswertung.

Ich danke Dr. Florenz Sasse und Bettina Hinkelmann für die Hilfe bei der Einführung in das Thema, die Bereitstellung des Hefestamms 1386 sowie der filamentösen Pilzstämmen und der hilfreichen Tipps.

Vielen Dank an meine Kollegen der 2. Etage des Y-Gebäudes. Insbesondere danke ich Klaus und Diana für den steten und sofortigen Beistand bei technischen und methodischen Problemen sowie für jeden netten Plausch.

Bei meiner lieben Projektgruppe „Biologische Systemanalyse“ (ehemals „Targetidentifizierung“) möchte ich mich bedanken für die großartige Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und die nette Atmosphäre. Besonderer Dank gilt Bianca für das fleißige Paperschicken und das Korrekturlesen. Liebe Sara, auch Dir danke ich recht herzlich für das Korrekturlesen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Nina bedanken. Du hast mir mit Deiner konstruktiven Kritik, wissenschaftlichen Diskussionen und freundschaftlichen Unterstützung sehr geholfen. Du bist super!

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern, meiner Tante und meinem Bruderherz Fabian. Ihr habt mir das Studium überhaupt erst ermöglicht und mich in meinem Tun immer unterstützt. Vielen Dank für Euer Vertrauen, Eure Geduld und dass Ihr immer an mich geglaubt habt.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Nick bedanken. Du bist immer für mich da und hast mich in allem unterstützt. Lieben Dank!!!